„Proform" und Funktions-Domänen von Colicin M

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
RALF-MICHAEL DREHER
aus Sigmaringen

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543906_0003

„Proform" und Funktions-Domänen von Colicin M

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
RALF-MICHAEL DREHER
aus Sigmaringen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	28. 4. 1983
Dekan:	Prof. Dr. Hadeler
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Braun
2. Berichterstatter:	Dr. Hantke

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Professor Dr. V. Braun am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. V. Braun möchte ich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken. Dies gilt vor allem auch für den Kauf neuer apparativer Einrichtungen, die mir meine Arbeit wesentlich erleichtert haben.

Herrn Dr. K. Hantke verdanke ich nicht nur intensive Diskussionen und wertvolle Ratschläge, sondern auch eine Einführung in das Gebiet der Genetik.

Herrn Dr. J.V. Höltje und Frau U. Schwarz danke ich für die Durchführung der in vitro Mureinsynthesen und Frau Dr. B. Wittmann-Liebold für die NH_2-terminale Sequenzierung von Colicin M und "Pro-Colicin M".

Mein besonderer Dank gilt Herrn S. Mollner, der mich nicht nur durch seine konstruktive Detailkritik und die vielen Anregungen, sondern auch durch seine Hilfsbereitschaft sehr unterstützt hat.

Frau H. Wolff fertigte Photographien an und sorgte für die Bereitstellung von Bakterienstämmen - vielen Dank.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für ihr kollegiales Verhalten und die gute Zusammenarbeit.

Abkürzungen

Abb.	Abbildungen
APM	Aminopeptidase M
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	Methylenbisacrylamid
CMC	Carboxymethylcellulose
CPA (B)	Carboxypeptidase A (B)
DE	s. DEAE
DEAE	Diäthylaminoäthyl
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
DTE	Dithioerithrit
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Di-Natriumsalz
ELISA	Enzym-Linked-Immunosorbent Assay
g	Erdbeschleunigung
l	Liter
M	molar
Min.	Minute(n)
MW	Molekulargewicht
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Std.	Stunde(n)
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	volume/volume (Volumenprozent)
w/v	weight/volume (Gewichtsprozent)

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung: Colicine	1
1.2	Einführung: Colicin M	5
1.3	Fragestellung	6
2.	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1	Materialien	6
2.1.1	Chemikalien	6
2.1.2	Nährmedien und Puffer	8
2.1.3	Geräte	9
2.1.4	Bakterienstämme	10
2.2	Methoden	11
2.2.1	Anzucht von Bakterien	11
2.2.2	Proteinbestimmung mit Fluram	12
2.2.3	Test auf Colicin M- und B-Aktivität	12
2.2.4	Immunitätstest gegenüber Colicin M und B	13
2.2.5	Entfernung von SDS	13
2.2.6	Bestimmung des COOH-Terminus	13
2.2.7	Aminosäureanalyse	14
2.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	14
2.2.8.1	Modifiziertes Elektrophoresesystem nach LAEMMLI	14
2.2.8.2	Anfärben von Polyacrylamidgelen	16
2.2.8.3	Flachbett-Gelelektrophorese ohne SDS	16
2.2.8.4	Aktivitätstests von Colicin M und Colicin M-Fragmenten in Gelen ohne SDS	18
2.2.9	Säulenchromatographische Methoden	18
2.2.9.1	Isolierung von Colicin M und Pro-Colicin M	18
2.2.9.1.1	Gewinnung der Rohextrakte	18
2.2.9.1.2	Reinigung von Colicin M mittels einer CMC52-Säule	19

		Seite
2.2.9.1.3	1. Reinigung von Pro-Colicin M mittels CMC52	19
2.2.9.1.4	2. Reinigung von Pro-Colicin M mittels CM50 Sephadex	19
2.2.9.2	Schnellmethode zur Isolierung von Colicin M und verändertem Colicin M aus Mutanten	20
2.2.9.3	HPLC-Trennung von ungespaltenem Colicin M und Colicin M-Fragmenten mittels TSK-Säule	20
2.2.9.4	Trennung von ungespaltenem Colicin M und Colicin M-Fragmenten mittels P30-Säule	21
2.2.9.5	Trennung von ungespaltenem Colicin M und Colicin M-Fragmenten mittels einer CMC52-Säule	21
2.2.9.6	Trennung von Colicin M-Fragmenten mittels einer CM50- und SE50-Sephadex-Säule	21
2.2.9.7	Trennung von Colicin M-Fragmenten mittels einer DEAE-Sephadex-Säule	22
2.2.9.8	Schnellmethode zur Isolierung von Colicin B	22
2.2.10	Proteolytische Spaltung von Colicin M mit verschiedenen Proteasen	22
2.2.10.1	Spaltung mit Trypsin	22
2.2.10.2	Spaltung mit Aminopeptidase M	23
2.2.10.3	Spaltung mit Chymotrypsin A_4	23
2.2.10.4	Spaltung mit Proteinase K	23
2.2.11	Schutz von Zellen vor Colicin M und dem Phagen T5 durch Colicin M-Bruchstück B und Pro-Colicin M	24
2.2.11.1	Überprüfung mit Hilfe der Lebendzellzahl	24
2.2.11.2	Überprüfung mit Hilfe des Biophotometer	25
2.2.12	Behandlung von osmotisch geschockten Zellen mit Colicin M-Bruchstück B und Pro-Colicin M	25
2.2.13	Genetische Methoden: Mu(Ap,lac)-Mutationen auf dem ColM-Plasmid	26
2.2.13.1	Konjugation des ColM-Plasmids	26
2.2.13.2	Mutagenese mit dem Phagen Mu(Ap,lac) (Transduction)	26
2.2.13.3	Suche nach Mutanten, die eine veränderte Colicin M-Aktivität besitzen	27
2.2.14	Aktivierung von Pro-Colicin M	27
2.2.14.1	Autoaktivierung	27

		Seite
2.2.14.2	Aktivierung mit verschiedenen Proteasen	28
2.2.14.3	Aktivierung mit Rohextrakten	28
2.2.14.4	Aktivierung durch Kreuzungen	29
2.2.14.5	Aktivierung mit Rattenleber-Mitochondrien	29
2.2.14.6	Aktivierung durch eine Signalpeptidase	30
2.2.15	Überprüfung der Mu(Ap,lac)-Mutanten durch Kreuzung	30
2.2.16	Immunchemische Methoden	31
2.2.16.1	Gewinnung von Antiserum gegen Colicin M	31
2.2.16.2	ELISA	31
2.2.16.3	Gelblotting und anschließend ELISA auf der Nitrocellulose-Folie	32
2.2.16.4	Ouchterlony-Test	34
2.2.17	In vitro-Colicin M-Aktivitätstest	34
2.2.18	Sequenzierung des NH_2-Terminus	34
3.	ERGEBNISSE	35
3.1	Isolierung von Colicin M	35
3.2	Sequenzierung des NH_2-Terminus von Colicin M	36
3.3	Proteolytische Spaltung von Colicin M mit verschiedenen Proteasen	37
3.3.1	Spaltung mit Trypsin	38
3.3.2	Spaltung mit Aminopeptidase M	39
3.3.3	Spaltung mit Chymotrypsin A_4	42
3.3.4	Spaltung mit Proteinase K	45
3.3.4.1	Proteinase K-Spaltung bei pH 8,0	45
3.3.4.2	Proteinase K-Spaltung bei pH 6,0	52
3.3.5	Spaltung mit Carboxypeptidase A und B (COOH-terminale Bestimmung)	54
3.4	Charakterisierung der Colicin M-Bruchstücke A und B	55
3.4.1	Charakterisierung von Bruchstück A	55
3.4.2	Charakterisierung von Bruchstück B	56
3.4.2.1	Bestimmung des COOH-Terminus	58
3.4.2.2	Bestimmung der Rezeptorbindeaktivität	59

		Seite
3.4.2.3	Wirkung von Bruchstück B auf osmotisch geschockte Zellen	63
3.4.2.4	In vitro-Aktivität von Bruchstück B	64
3.5	Antikörper gegen Colicin M	65
3.6	Suche nach Mu(Ap,lac)-Mutanten, die in ihrer Colicin M-Aktivität beeinträchtigt sind	65
3.6.1	Charakterisierung der Mutanten	66
3.6.1.1	Colicin M- und Colicin B-Aktivität und Immunität	66
3.6.1.2	Schnellmethode zur Isolierung von Colicin M und verändertem Colicin M	67
3.6.1.3	Konjugation des mutierten ColM, B-Plasmids	69
3.7	Nachweis und Charakterisierung von Pro-Colicin M	69
3.7.1	Isolierung von Pro-Colicin M	70
3.7.2	Chemische Charakterisierung von Pro-Colicin M	75
3.7.2.1	Molekulargewichtsbestimmung	75
3.7.2.2	Sequenzierung des NH_2-Terminus	76
3.7.2.3	Bestimmung des COOH-Terminus	77
3.7.3	Aktivierung von Pro-Colicin M	79
3.7.3.1	Autoaktivierung	79
3.7.3.2	Andere Aktivierungsmethoden von Pro-Colicin M	79
3.7.4	Bestimmung der Rezeptorbindeaktivität	80
3.7.5	Wirkung von Pro-Colicin M auf osmotisch geschockte Zellen	81
3.7.6	In vitro-aktivität von Pro-Colicin M	82
3.7.7	Immunchemische Kreuzreaktion von Pro-Colicin M und Colicin M mit ELISA und Ouchterlonytest	82
3.8	Versuch des Nachweises von Pro-Colicin B	84
3.8.1	Schnellreinigung von Colicin B	84
3.8.2	Molekulargewichtsbestimmung von Colicin B	86
3.8.3	ELISA mit Colicin B und "Pro-Colicin B"	87
3.8.4	ELISA an einem geblotteten Gel	87
4.	DISKUSSION	90
4.1	Domänen bei Colicin M	90
4.2	"Proform" von Colicin M	93

		Seite
5.	ZUSAMMENFASSUNG	97
6.	LITERATURVERZEICHNIS	99

1. Einleitung

1.1 Einführung: Colicine

Die Erforschung der Colicine ist schon über 50 Jahre alt. Als erster beschrieb André Gratia schon 1925 den Antagonismus zwischen zwei E. coli Stämmen (32). Das Filtrat der einen Kultur hemmte wesentlich die Vermehrung des anderen Stammes der gleichen Art. Gratia erkannte, daß eine antibiotische Substanz der aktive Faktor war und nannte sie "Prinzip V" (das heutige Colicin V). Ein Schüler Gratias, Pierre Fredericq, führte ab 1946 die Arbeiten Gratias weiter und legte die Grundlagen aller heutigen Hauptrichtungen der Colicinforschung (8).

Doch erst Untersuchungen der letzten Jahre haben einen Einblick in die Synthese der Colicine und ihren Wirkungsmechanismus verschafft. Eine wichtige Entdeckung war dabei der Nachweis, daß alle bekannten Colicine von Plasmid-DNA codiert werden (60).

Colicine gehören der Substanzklasse der Bacteriocine an und werden von bestimmten Stämmen der Familie der Enterobacteriaceae, speziell der Gattung Escherichia coli, synthetisiert. Es sind antibiotisch wirksame Proteine mit einem Molekulargewicht von 30.000 bis 90.000 Dalton (10, 53).

Der molekulare Mechanismus der Colicinwirkung gliedert sich in drei Schritte (25, 29, 49a, 49):

(I) Spezifische Bindung an den Rezeptor sensitiver Zellen;

(II) Transport durch die Zellmembranen in das Innere der Zelle;

(III) Enzymatische Aktivität wie z.B. Depolarisierung der Cytoplasmamembran (Colicin E1), DNA-Endonukleaseaktivität (Colicin E2) (57), RNase-Aktivität (Colicin E3) (7) oder Inhibition der Mureinbiosynthese (Colicin M) (56).

Von diesen drei Schritten ist der zuletzt genannte am besten untersucht.

Man kennt heute die Wirkungsweise der meisten Colicine, wobei der Wirkungsmechanismus, d.h. wie die Wirkung zustande kommt, oft noch im Dunkeln liegt.

Bei der Bindung des Colicins an den Rezeptor und vor allem bei der Translokation in das Innere der Zelle zum Wirkort sind noch viele Fragen offen.

Bekannt ist bisher, daß als Rezeptoren immer Proteine auf der äußeren Membran dienen, wobei ein und derselbe Rezeptor von verschiedenen Colicinen benutzt werden kann und außerdem auch noch von verschiedenen Phagen (11). Da die Bindung eines Colicins oder eines Phagen ein tödliches Ereignis für die Zelle darstellt, war es lange Zeit unverständlich, warum es in der Natur Colicin-Rezeptoren gibt. Man sollte erwarten, daß im Laufe der Evolution die sensitiven Zellen durch resistente ersetzt werden sollten (resistente Zellen besitzen keinen oder einen veränderten Rezeptor) (60). Diese anscheinend paradoxe Situation hat eine Erklärung darin gefunden, daß diese Rezeptoren noch andere funktionelle Aufgaben besitzen wie z.B. das BtuB Protein, das als Rezeptor für die Colicine E1, E2 und E3 und den Phagen BF23 dient, aber auch für die Aufnahme von Vitamin B12 verantwortlich ist (26), oder das fepA Protein, das neben den Colicinen B und D auch den Eisen-Enterochelin-Transport vermittel (33, 52), oder das fhuA Protein, das neben seiner Eigenschaft als Rezeptor für Colicin M und die Phagen T1, T5 und Ø80 auch die Aufnahme von Eisen als Ferrichrom-Komplex katalysiert (12, 44). Stämme mit solchen Rezeptoren haben einen Selektionsvorteil gegenüber Stämmen ohne Rezeptoren. Offensichtlich überwiegt in der freien Natur dieser Vorteil den Nachteil, möglicherweise durch ein Colicin oder einen Phagen getötet zu werden.

Welche Art von Bindung das Colicin mit dem Rezeptor eingeht, ist noch unklar. Auch weiß man nicht, ob das Colicin an den Rezeptor gebunden in das Innere der Zelle bis zu seinem Wirkort hineinragt, oder aber sich völlig vom Rezeptor löst und in das Zellinnere transportiert wird. Ebenso ist die Frage noch offen, ob Colicine erst an der Zelloberfläche, eventuell durch Proteasen, aktiviert werden, wie das von der Wirkung des Diphterie- und Cholera-Toxins auf Eukaryontenzellen bekannt ist (18, 51). Für die

Colicine E1, E2, E3 und K wurde zwar gezeigt, daß sie von der äußeren Membran von sensitiven Zellen proteolytisch in zwei Fragmente gespalten werden, wobei die COOH-terminalen Fragmente durch die Zellmembran an ihren Wirkort transportiert werden, während die NH_2-terminalen Fragmente an den Rezeptor binden (67). Doch scheint diese Spaltung der Colicine für ihre enzymatische Aktivität nicht notwendig zu sein, da die intakten Colicinmoleküle sowohl in vitro Aktivität zeigen als auch resistente Zellen abtöten, wenn die Permeabilitätsschranke der äußeren Membran durch Behandlung mit osmotischem Schock überwunden wird, im Gegegensatz zu den Toxinen von Diphterie und Cholera, die im ungespaltenen Zustand keine in vitro Aktivität zeigen (59). Sicher ist, daß eine Rezeptorbindung oder das Vorhandensein eines aktiven Rezeptors für eine proteolytische Aktivierung, falls diese notwendig ist, keine Voraussetzung ist (6, 13). Für das Colicin A und E1 konnte sogar gezeigt werden, daß durch die proteolytische Spaltung an der Zelloberfläche die Aktivität verringert wird, da durch Proteasehemmer die Colicinaktivität gesteigert werden konnte (13).

Auch wenn die proteolytische Spaltung der Colicine nichts mit ihrer Translokation oder ihrer Aktivierung zu tun haben, wurde in diesem Zusammenhang erkannt, daß sich die drei Schritte des molekularen Mechanismus der Colicine in verschiedenen Domänen auf der Polypeptidkette befinden. Für die E-Colicine, für Cloacin DF13, Colicin K und Colicin Ia wurden die funktionalen Domänen bestimmt. Das Ergebnis war für alle Colicine gleich: der COOH-terminale Teil des Colicins ist für die jeweils verschiedene enzymatische Aktivität verantwortlich, der Zentralteil für die Rezeptorbindung und der NH_2-Terminus für die Translokation des Moleküls zu seinem Wirkort (21, 25, 49a, 49, 66, 67).

Doch nicht nur die Frage der Rezeptorbindung und Translokation ist bei den Colicinen von Interesse, sondern auch der Vorgang der Exkretion aus der Produzentenzelle und die Immunität der Produzentenzelle gegen ihr eigenes Colicin.

Periplasmatische und äußere Membranproteine von E. coli werden an membrangebundenen Polysomen in einer Proform synthetisiert (54). Diese kur-

ze Proteinverlängerung, die von Blobel Signalsequenz genannt wird (3), wird von membrangebundenen Proteasen während des Transportes durch die Membran abgespalten (17, 36, 37). Die meisten bis jetzt in ihrer Primärstruktur aufgeklärten Signalsequenzen (3a, 37, 47, 70) weisen am NH_2-Terminus eine hydrophile Region von nicht mehr als acht Aminosäuren auf, die durch die Anwesenheit von mindestens zwei Lysin-, Arginin- oder Histidinresten stark basisch ist. Es schließt sich eine vorwiegend hydrophobe Region von 15-19 Aminosäuren an, die bis zum Ende der Vorläufersequenz, der Spaltstelle, reicht.

Eine solche NH_2-terminale Verlängerung konnte bisher für kein Colicin nachgewiesen werden (38). Eine Untersuchung über den Export von Colicin E1 und E3 zeigt, daß die beiden Colicine erst längere Zeit nach ihrer Synthese die Zelle verlassen durch einen nichtspezifischen Mechanismus, der in einem Anstieg der Permeabilität resultiert und, bei induzierten Zellen, auf die Lyse der Zelle hinausläuft (38). Im Gegensatz dazu verläßt Cloacin DF13 die Produzentenzelle, ohne daß es zur Lyse kommt.

Um den Export der Colicine zu verstehen, führen Varenne, Cavard und Lazdunksi die Möglichkeit einer nicht prozessierten inneren Signalsequenz an (63), ähnlich wie bei Ovalbumin (42). Eine solche innere Signalsequenz wurde eventuell durch das Auffinden einer Proform von Colicin E1 von Watson nachgewiesen (66), der eine COOH-terminale Verlängerung von Colicin E1 fand. Eine Bestätigung seiner Untersuchung brachte die Nukleotid-Sequenz des Strukturgens von Colicin E1 (73), da die Verlängerung des COOH-terminalen Endes Sequenzhomologien zu den Signalsequenzen von Prolipoprotein und Pro-ß-Lactamase zeigte und außerdem noch das gemeinsame Merkmal der Signalsequenzen trug, nämlich den hydrophoben Charakter (23). Es konnte bis heute aber nicht eindeutig geklärt werden, ob diese Verlängerung des COOH-Terminus der Colicin E1 Ausscheidung oder der zellulären Immunität gegenüber Colicin E1 oder aber beiden Prozessen dient.

Damit wäre das Problem der Immunität der Produzentenzelle dem eigenen Colicin gegenüber angesprochen. Für die Colicine E2, E3 und Cloacin DF13 konnte ein an die Colicine nicht kovalent gebundenes Immunitätsprotein nachgewiesen werden; Colicin und Immunitätsprotein sind assoziiert und

und werden als Komplex ausgeschieden (24, 39, 57). Beim Colicin Ia konnte ein 14.500 Dalton Protein in der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden, das für die Neutralisierung des Colicin Ia verantwortlich ist und damit für die Immunität der Produzentenzelle (69). Ob dieser Mechanismus der zellulären Immunität auf die meisten anderen Colicine auch zutrifft oder sich, wie bei Colicin El, bei dem trotz intensiver Suche kein Immunitätsprotein nachgewiesen werden konnte, ein anderer Mechanismus anbietet, liegt noch völlig im Dunkeln.

1.2 Einführung: Colicin M

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Colicin M. Colicin M ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 27.000 und einem isoelektrischen Punkt von 9,5 (55). Colicin M-sensitive Zellen benötigen ein aktives fhuA-Genprodukt, das als Rezeptor dient; außerdem gehört Colicin M zu der Colicingruppe B, denen gemeinsam ist, daß tonB-Mutanten gegen sie tolerant sind (22). Neben den tonB-Mutanten gibt es noch tolM-Mutanten, die ebenfalls gegen hohe Dosen Colicin M tolerant sind. Der Genort des tolM-Gens spielt am Wirkort selbst keine Rolle, sondern in der Translokation von Colicin M in das Zellinnere (56). Wirkt Colicin M auf sensitive Zellen ein, so kann man nach etwa 10-20 Min. Lyse der Zellen beobachten, eine penicillinähnliche Wirkung. In Gegenwart von 16 % Zucker verformen sich Colicin M-behandelte Zellen zu Sphäroplasten (10). Genauere Untersuchungen ergaben eine Hemmung der Mureinbiosynthese, wobei der molekulare Mechanismus der Wirkung von Colicin M noch nicht bekannt ist. Eine Mureinhydrolase scheint Colicin M nicht zu sein (55). Da nur wenige Moleküle Colicin M nötig sind um eine Zelle abzutöten (55), stellt es warscheinlich ein Inhibitor eines enzymatischen Schrittes in der Mureinbiosynthese dar.

Wie die Immunität der Produzentenstelle gegenüber Colicin M zustande kommt, konnte bisher nicht geklärt werden, da trotz intensiver Suche kein Immunitätsprotein identifiziert werden konnte.

1.3 Fragestellung

Es sollte untersucht werden, wo sich die funktionalen Domänen wie

(I) Rezeptorbindung
(II) Translokation
(III) Hemmung der Mureinbiosynthese

im Colicin M-Molekül befinden, um einen Vergleich mit anderen Colicinen zu ermöglichen. Da sich Colicin M durch seine Wirkung auf sensitive Zellen, der Hemmung der Mureinbiosynthese und auch durch seine geringe Größe sehr stark von allen anderen bisher bekannten Colicinen unterscheidet, war es das Ziel dieser Arbeit festzustellen, ob die Verteilung der Domänen auf der Polypeptidkette in ganz bestimmte Bereiche auch auf Colicin M zutrifft und dies eventuell ein gemeinsames Merkmal aller Colicine darstellt.

Bei dem Versuch, durch eine Mutagenese mit dem Phagen Mud2(Ap,lac) ein Colicin M zu erhalten, das nicht mehr vollständig synthetisiert wird und dem damit der COOH-Terminus fehlt, konnten zwei Mutanten isoliert werden, die ein um etwa 4.000 Dalton größeres Colicin M produzieren, das völlig inaktiv war. Die Charakterisierung dieser Proform von Colicin M ermöglichte die Aufstellung einer These über das Zustandekommen der Immunität der Prodzentenstelle gegenüber Colicin M.

2. Material und Methoden

2.1 Materialen

2.1.1 Chemikalien

Beckmann:	Eichstandard zur Aminosäureanalyse
Behring:	Freundsches Adjuvans
	Rinderserumalbumin (Gelmarker)
	Human Transferrin (Gelmarker)

Bio Rad:	Dowex-Anionenaustauscher 1 x 8
	Bio Gel P2
	Bio Gel P30
Boehringer:	ATP
	Carboxypeptidase A
	Carboxypeptidase B
	Chymotrypsin A_4
	Proteinase K
Difco:	Bacto-Agar
	Bacto-Trypton
	MacConkey Agar-Base
	Yeast-Extrakt
Miles:	Alkaline Phosphatase Anti Rabbit IgG
	St. aureus Protease
Pharmacia:	C M-50-Sephadex
	DEAE-Sephadex
	SE-50-Sephadex
Serva:	Acrylamid
	3-Amino-9-Äthyl-Carbazol
	Ampicillin
	Bisacrylamid
	Carboanhydrase (Gelmarker)
	Coomassie Brilliant Blue G250
	Desoxyribunuklease I
	Digitonin
	Fluram
	Insulin (Gelmarker)
	Merkaptoäthanol
	Myoglobin (Gelmarker)
	Norleucin
	Ovalbumin
	Phenylmethylsulfonylfluorid
	Polyäthylenglykol 20.000
	Pronase
	TM ED
	Triton X-100

Sigma:	N-Äthylmorpholin
	Cytochrom C
	Mitomycin C
	Neomycin
	p-Nitro-Phenyl-phosphat
	Rinderserumalbumin
	Tetracyclin
Spectrapor:	Dialyseschläuche
Upjohn:	Spectinomycin
Whatman:	CM C52
	DE 52 Cellulose

Antikörper gegen Colicin B wurden von P. Reeves (University of Adelaide, South Australia) zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen Chemikalien wurden analysenrein von Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Nährmedien und Puffer

Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter Medium oder 1 Liter Puffer.

TY-Medium:	Bacto-Trypton	8,0	g
	Hefeextrakt	5,0	g
	NaCl	5,0	g
M9-Minimalmedium:	$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	7,5	g
	KH_2PO_4	3,0	g
	NaCl	0,5	g
	NH_4Cl	1,0	g
	D(+)-Glucose	4,0	g
	$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,25	g
	$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,015	g
MacConkey-Medium:	MacConkey Agar-Base	40,0	g
	C-Quelle	10,0	g

Plattenmedium:	Zum Grundrezept kommen jeweils 15 g Bacto-Agar, für Weichagar 7,5 g, hinzu.		
PBS:	NaCl	8,0	g
	KCl	0,2	g
	Na_2HPO_4	1,15	g
	KH_2PO_4	0,2	g
	pH 7,3		
Colicin M-Puffer:	NaH_2PO_4	10	mM
	Triton X-100	0,1	%
	NaN_3	0,02	%
	DTE	1	mM
	pH 6,0		

2.1.3 Geräte

Biotronik:	Aminosäureanalysator LC 6005 E
Spectra Physics:	Integrator System I Computing für Aminosäureanalysator
Kontron:	HPLC-Pumpe LC 410 Photometer Uvikon 725 für HPLC
Hewlett-Packard:	Integrator 3390 A für HPLC
Bio-Rad:	Gel-Elektrophorese-Apparatur Gel-Plotter
LKB:	Flachbett-Gel-Elektrophorese
Isko:	Photometer und Schreiber (Säulenchromatographie)
Instruments GmbH München Bonet-Maury:	Biophotometer

2.1.4 Bakterienstämme

Bezeichnung	Merkmale	Herkunft
E. coli K12		
R 2.1	ColB	(72)
WO 788	ColV	(788)
MO 6	P1 Transduction von 3282 tolM42 in AB 2847	(351)
Mal 315	Mu, cts d2 (Ap,lac), mal (λ^R)::Mu cts ara D139 strA	(641)
Mal 103	Mu, cts d1 (Ap,lac) F^-, araB::Mu cts ara D139 strA	(442)
KH 1422	abgeleitet von AB 2847 cir rpsL	(1422)
MC 4100	F^-, ara D139, Δlac U169, strA	(443)
ZI 397	rpsE, str^r Tet^r $Spec^r$, Δlac, aroB, araD	L. Zimmermann
AB 2847	aroB thi malT tsx	
188	abgeleitet von AB 2847 fepA	(188)
P 8	abgeleitet von AB 2847 fhuA	(245)
199	abgeleitet von AB 2847 fhuA fepA	(199)
DR 855	(166a) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud2 diese Arbeit	(855)
DR 856	(232b) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud2 diese Arbeit	(856)
DR 857	(P1) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud1 diese Arbeit	(857)
DR 858	(P2) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud1 diese Arbeit	(858)
DR 859	(P3) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud1 diese Arbeit	(859)
DR 860	(P4) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud1 diese Arbeit	(860)
DR 861	(P7) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud2 diese Arbeit	(861)
DR 862	(P8) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud2 diese Arbeit	(862)
DR 863	(P9) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud2 diese Arbeit	(863)
DR 864	(P10) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud2 diese Arbeit	(864)

Bezeichnung	Merkmale	Herkunft
DR 865	(P11) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud2 diese Arbeit	(865)
DR 866	(P12) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud1 diese Arbeit	(866)
DR 867	(P13) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud1 diese Arbeit	(867)
DR 868	(P14) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud1 diese Arbeit	(868)
DR 869	(P6) aus DR 871 (ColM, ColB)::Mud1 diese Arbeit	(869)
DR 870	abgeleitet von 1422 (ColM, ColB) diese Arbeit	(870)
DR 871	(443(p1M44)), F^-, ara D139, Δlac U169, strA (p1M44, Tet^r) diese Arbeit	(871)
DR 872	(ZI397/232b) aus ZI397, diese Arbeit	(871)
E. coli C1139	(ColM, ColB), leu lac thi	(316)
E. coli 32T19	(ColM)	(33)

Bedeutung der Merkmalsbezeichnungen siehe Bachmann und Low (2). Die Zahlen in Klammer unter "Merkmale" geben die alte Bezeichnung der Stämme an (Protokollhefte), während die Zahlen in Klammer unter "Herkunft" die Stamm Nr. in der Stammsammlung Mikrobiologie II, Tübingen, angeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von Bakterien

Eine Vorkultur im betreffenden Medium wird mit Zellen von einer TY-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Sie dient zum Animpfen der Hauptkultur zu einer Anfangs-OD von 0,05.

Soll Colicin M oder verändertes Colicin M isoliert werden, wird bei Erreichen einer OD 0,3 mit Mitomycin C(0,1 - 0,5 µg/ml) induziert und nach weiteren 2 Std. die Zellen durch Zentrifugation (5.000 xg, 15 Min., 4°C) sedimentiert.

2.2.2 Proteinbestimmung mit Fluram (4, 15)

Lösung A: 0,5 M Natriumborat, pH 9,0

Lösung B: 30 mg Fluram in 100 ml Dioxan

Verfahren: 10 bis 250 µl Proteinlösung wird mit Lösung A auf 1,5 ml aufgefüllt und unter starkem Rühren (Vortex) 0,5 ml von Lösung B zugegeben. Nach 10-60 Min. wird die Fluoreszenz gemessen (Eppendorf-Photometer 1101 M mit Fluoreszenz-Zusatz 1030).

Anregungsbereich: 405-436 nm

Meßbereich: 470-3.000 nm

Eichung mit 10-100 µg Rinderserumalbumin.

2.2.3 Test auf Colicin M- und B-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mit einem Spottest nach Goebel und Barry (30). TY-Agarplatten werden mit 3 ml TY-Top-Agar überschichtet, der etwa 10^8 frisch gewaschene Zellen des Indikatorstammes für Colicin M (188) bzw. Colicin B (P8) enthält. Auf die erstarrte Oberfläche werden jeweils 10 µl der verschiedenen Colicin-Verdünnungen pipettiert. Verdünnt wird mit einer 0,1 % wäßrigen Tritonlösung, und zwar meistens in Zehner-, nur an kritischen Stellen in Fünfer-Schritten.

Die Platten werden nach dem Eintrocknen der Flüssigkeit über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Verdünnung, aus der 10 µl gerade noch einen klaren Lysehof im Bakterienstamm ergibt, wird als Titer bezeichnet. Ist das z.B. bei einer 10.000fachen Verdünnung der Fall, so liegt ein Colicin-Titer von 10^4 vor. Der Test ist bis auf einen Faktor 10 genau.

2.2.4 Immunitätstest gegenüber Colicin M und B

Der Test erfolgt wie unter 2.2.3 beschrieben. Als Indikatorstamm dient der Stamm, der auf Immunität gegenüber Colicin M und Colicin B getestet werden soll. Die Colicin-Verdünnung, aus der 10 µl gerade noch einen klaren Lysehof im Bakterienrasen des Teststammes ergibt, wird als Immunitätsteter bezeichnet.

Die Immunitätstiter verschiedener Stämme kann man nur dann vergleichen, wenn genau die gleiche Colicin-Lösung benutzt wurde.

2.2.5 Entfernung von SDS

Der HPLC-Puffer für die Trennung von Colicin M und aktiven Colicin M-Bruchstücken auf der TSK-Säule enthielt 0,05 % SDS. Da die Aktivität sowohl von Colicin M wie von aktiven Bruchstücken einige Stunden nach der Trennung von SDS zerstört wurde, wurde versucht, SDS zu entfernen.

a) Mit Hilfe von Dowex-Anionen-Austauscher 1 x 8.

Zu 1 ml (0,5 mg SDS) isoliertem Colicin M oder Colicin M-Bruchstück wurde 1,5 mg Ionenaustauscher gegeben und nach einer Stunde abzentrifugiert. Der Ionenaustauscher wurde vorher in seine Phosphat-Form überführt (41).

b) Mit Hilfe von Kalium-Phosphat Puffer.

Fällungsreagenz: 0,4 M Kalium-Phosphat pH 7,4.
Es wurde volumenmäßig die doppelte Menge Fällungsreagenz zur SDS-Lösung gegeben und abzentrifugiert.

2.2.6 Bestimmung des COOH-Terminus (1)

Das COOH-terminale Ende von Colicin M, Colicin M-Bruchstück B und Pro Colicin M wurde mit Carboxypeptidase A und B bestimmt.

Carboxypeptidase A wurde vorher präpariert (28). 50 nM - 110 nM Proteinlösung wurde gegen 0,1 M NaCl und 0,05 M N-Äthyl-Morpholinacetat pH 8,5 dialysiert und anschließend Carboxypeptidase A oder B (Enzym/Substrat Verhältnis 1:50) direkt in den Dialyseschlauch gegeben. Um die Dialyse zu kontrollieren, wurden jedesmal 25 nM Norleucin zugesetzt. Dialysiert wurde gegen 15 ml deion. Wasser 15 Std. bei 37°C und leichtem Schütteln. Das Dialysat wurde anschließend eingedampft, in Natriumcitratpuffer aufgenommen und die abgespaltenen Aminosäuren mittels Aminosäureanalyse bestimmt.

2.2.7 Aminosäureanalyse

Protein in bidest. 6 n Salzsäure wurde unter Stickstoff in Hydrolyseröhrchen eingeschmolzen und 18 Std. bei 110°C erhitzt. Die Salzsäure wurde im Wasserstrahlvakuum abdestilliert, der Rückstand zweimal in wenig Wasser aufgenommen und wieder eingedampft.

Nach Aufnehmen des Hydrolysats in Natriumcitratpuffer (0,2 N Natriumcitrat, pH 2,2) erfolgte die Analyse der Proben im Einsäulenverfahren mit einem Aminosäure-Analysator. Ein angeschlossener Rechner druckte die jeder Aminosäure zugeordnete Fläche unter der Chromatogrammkurve aus. Anhand von Vergleichsanalysen eines Standardgemisches ließen sich die Flächenwerte in Nanomole Aminosäure umrechnen. Bei dieser sauren Hydrolyse kann die Aminosäure Tryptophan nicht bestimmt werden.

2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.2.8.1 Modifiziertes Elektrophoresesystem nach LAEMMLI (40, 45)

Acrylamidlösung I:	44,4 g Acrylamid + 0,8 g Bis	mit dest. deion.
Acrylamidlösung II:	30,0 g Acrylamid + 0,8 g Bis	H_2O ad 100 ml.
Trenngelpuffer:	0,75 M Tris/HCl pH 8,8	
Sammelgelpuffer:	0,25 M Tris/HCl pH 6,8	

		11 %	17 %
Trenngelmischung:	Acrylamidlösung I	6,25 ml	10,0 ml
	dest. deion. Wasser	5,15 ml	1,4 ml
	Trenngelpuffer	12,5 ml	
	SDS (10 % w/v)	0,5 ml	
	Ammoniumpersulfat (10 mg/ml)	0,63 ml	
	TMED	0,05 ml	
Sammelgelmischung:	Acrylamidlösung II	1,25 ml	
	dest. deion. Wasser	4,60 ml	
	Sammelgelpuffer	6,25 ml	
	SDS (10 % w/v)	0,12 ml	
	Ammoniumpersulfat (10 mg/ml)	0,32 ml	
	TMED	0,025 ml	
Elektrodenpuffer:	Tris	12,1 g	mit dest. deion. Wasser ad 4 l
	Glycin	57,7 g	
	SDS	4,0 g	
Auftragspuffer, doppelt konzentriert:			
	Tris/HCl	0,125 M	pH 6,8
	SDS	4 %	(w/v)
	Glycerin	20 %	(v/v)
	Merkaptoäthanol	10 %	(v/v)
	Bromphenolblau	0,002 %	(w/v)

Die Sammel- und die Trenngelmischung werden ohne TMED hergestellt, 6 Min. im Wasserstrahlvakuum entgast, TMED beigemischt und die Lösung mit einer Pipette zwischen die Glasplatten des Geräts gegossen. Überschichten des Trenngels mit Isobutanol erzeugt eine glatte Oberfläche. Nach Verfestigung des Trenngels und Abgießen des Isobutanols wird das Sammelgel aufgebracht.

Verwendet wird eine Flachgelapparatur mit den Abmessungen 100 x 140 mm^2. Die Stärke des Gels beträgt 0,75 mm.

Proben in wäßriger Lösung werden mit gleichem Volumen doppelt konzentriertem Auftragspuffer versetzt, 5 Min. gekocht und nach Zentrifugation in die Taschen des Sammelgels eingefüllt.

Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Stromstärke von 12,5 mA/Gel. Die Laufzeit beträgt 4 1/2 Std.

2.2.8.2 Anfärben von Polyacrylamidgelen (27)

Zur Anfärbung der Proteine werden die Gele für 1 - 2 Std. in Lösung I und anschließend für 5 - 10 Std. in Lösung II inkubiert.

Lösung I:	10 % (v/v)	Essigsäure	
	25 % (v/v)	Isopropanol	
	0,03 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250	
Lösung II:	10 % (v/v)	Essigsäure	

2.2.8.3 Flachbett-Gelelektrophorese ohne SDS

Trenngelpuffer und Elektrodenpuffer sind identisch:

	Tris	0,09 M
	Borsäure	0,08 M
	pH 8,3	

		11 %
Trenngelmischung:	Acrylamidlösung I	6,25 ml
	dest. deion. Wasser	5,15 ml
	Trenngelpuffer	12,5 ml
	Ammoniumpersulfat (10 mg/ml)	0,63 ml
	TMED	0,05 ml
Sammelgelmischung:	Wie unter 2.2.8.1 beschrieben ohne SDS	

Trenngel- und Sammelgelmischung werden wie unter 2.2.8.1 beschrieben behandelt. Nach Verfestigung des Trenngels wird ein 3 cm breites Sammelgel darüber gegossen und darauf wieder ein Trenngel. In der Mitte des Gels befindet sich also ein 3 cm breites Sammelgel, auf das die Proben mit Hilfe von Filterrondellen ohne Auftragpuffer gebracht werden.

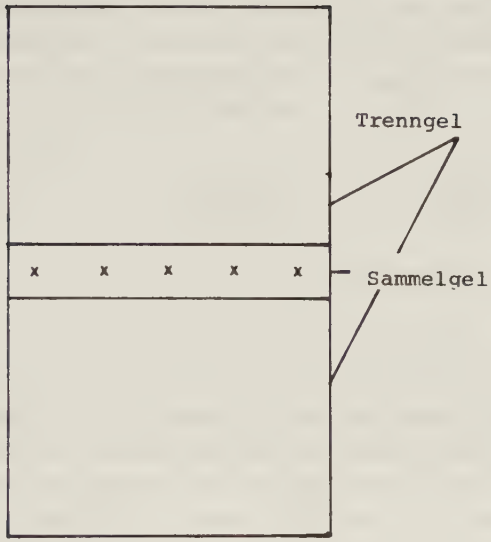


Abb. 1: Anordnung zur Flachbett-Gelelektrophorese ohne SDS.

Verwendet wurde eine Flachbett-Gelelektrophoreseapparatur mit den Abmessungen 12,5 x 26 cm. Die Stärke des Gels beträgt 1,5 mm.

Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 10 mA unter Wasserkühlung. Die Laufzeit wurde zwischen 2 - 30 Std. variiert.

2.2.8.4 Aktivitätstest von Colicin M und Colicin M-Fragmenten in Gelen ohne SDS

Gelbereiche, in denen Colicin M oder Colicin M-Fragmente liefen, wurden sofort nach Beendigung der Elektrophorese ausgeschnitten und entweder direkt auf eine TY-Platte gelegt und mit Top-Agar und Indikatorstamm überschichtet oder mit 0,1 % Tritonlösung 1 Std. extrahiert und mit dem Überstand wie unter 2.2.3 beschrieben der Aktivitätstest durchgeführt.

2.2.9 Säulenchromatographische Methoden

2.2.9.1 Isolierung von Colicin M und Pro-Colicin M

2.2.9.1.1 Gewinnung der Rohextrakte (55)

Mit 500 ml einer Übernachtkultur des Stammes E. coli K12 DR 855 wurden 100 l M9-Medium im Fermenter bei 37°C angeimpft. Da der Stamm scherkraftempfindlich ist, wurde nicht gerührt, sondern nur stark belüftet. Bei Erreichen der OD 0,3 wurde mit Mitomycin C induziert (2.2.1) und nach weiteren 3 Std. die Zellen geerntet. Die nassen Zellen wurden bei -20°C eingefroren.

200 g gefrorene Zellen von E. coli C1139 oder E. coli K12 DR 855 wurden in 400 ml dest. Wasser suspendiert, in dem 1 µg/ml DNase enthalten war und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellmembranen wurden 4 Std. bei 27.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels 2 M Natriumacetatlösung pH 5,1 langsam auf pH 5,2 titriert und anschließend wieder 30 Min. bei 27.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt, während das Sediment in 100 ml 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 suspendiert und wie oben beschrieben noch einmal auf pH 5,2 titriert und zentrifugiert wurde. Dieser Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereint und stellte den Rohextrakt dar. Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt.

2.2.9.1.2 Reinigung von Colicin M mittels einer CMC52-Säule (55)

Der Rohextrakt wurde 4mal gegen je 10 l Colicin M-Puffer dialysiert, mit dem auch die CMC52-Säule (3,5 x 75 cm) äquilibriert wurde. Nach Zentrifugation (1 Std. bei 27.000 xg) des Rohextraktes wurde er auf die Säule gepumpt. Fraktionen von 10 ml/Std. wurden gesammelt und auf Colicin-Aktivität getestet. Colicin B wird nicht an die Säule gebunden und läuft direkt durch. Nach dem Auftragen der Colicinlösung wurde mit 3 l Colicin M-Puffer gewaschen und anschließend ein linearer 10 l Gradient mit 0 bis 0,3 M NaCl angelegt. Colicin M wird nach etwa 4,5 l eluiert. Die Fraktionen mit hoher Colicin M-Aktivität wurden mittels Gel-Elektrophorese, HPLC (TSK-Säule) und Proteinbestimmung auf Reinheit und Konzentration überprüft.

2.2.9.1.3 1. Reinigung von Pro-Colicin M mittels CMC52

Die Reinigung wurde wie unter 2.2.9.1.2 beschrieben durchgeführt, wobei der Elutionspuffer kein Triton enthielt. Da Pro-Colicin M inaktiv ist, können die Hauptfraktionen nicht durch Aktivitätstest gefunden werden, sondern es müssen alle Fraktionen mittels Gel-Elektrophorese untersucht werden.

2.2.9.1.4 2. Reinigung von Pro-Colicin M mittels CM50 Sephadex

Pro-Colicin M-Lösungen aus der CMC52-Säule wurden im Dialyseschlauch mit Polyäthylenglykol auf etwa 1/10 des ursprünglichen Volumens eingeengt und anschließend gegen 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0, mit dem auch die Sephadex-Säule (V = 20 ml) äquilibriert wurde, dialysiert und auf die Säule gepumpt. Mit 100 ml Puffer wurde gewaschen und danach ein 400 ml NaCl-Gradient von 0,0 bis 0,15 M angelegt.

Fördermenge: 5 ml/Std.

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Gel-Elektrophorese überprüft.

2.2.9.2 Schnellmethode zur Isolierung von Colicin M und verändertem Colicin M aus Mutanten

Aus 500 ml TY-Kulturen, die, wenn es sich um Mu(Ap,lac)-Mutanten handelte, 25 µg/ml Ampicillin enthielten, wurden wie unter 2.2.9.1.1 beschrieben die Rohextrakte hergestellt. Die gewonnenen Zellen wurden in 5 ml Wasser aufgenommen. Auf den Fällungsschritt mit 2 M Natriumacetat wurde verzichtet.

Die Rohextrakte wurden dann im "batch"-Verfahren mit äquilibriertem Ionenaustauscher CMC52 (10 mM Na-P-Puffer pH 6,0) in einer Glasfritte (Schott 2) behandelt, mit Puffer gewaschen und mit 2 ml Puffer, der 0,15 M NaCl enthielt, Colicin M oder verändertes Colicin M eluiert. Die grob gereinigten Lösungen, in denen sich Colicin M oder verändertes Colicin M befand, wurden mittels Gel-Elektrophorese überprüft.

2.2.9.3 HPLC-Trennung von ungespaltenem Colicin M und Colicin M-Fragmenten mittels TSK-Säule (35)

Die Trennung von Colicin M von seien durch Proteasen erhaltenen Abbauprodukten erfolgte mit einer HPLC-Säule TSK Gel G3000 SW. Aufgespritzt wurden 25-50 µg Protein in 50-100 µl Reaktionsgemisch. Die Elution erfolgte mit einem 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0, der 0,05 % SDS enthielt und war nach etwa 20 Min. beendet. Die Fördermenge betrug 1 ml/Min., was einem Druck von 25 bar entsprach. Verfolgt wurde die Trennung mit einem Photometer von Kontron (Meßwellenlänge 230 nm), das mit einem Integrator (Hewlett-Packard) verbunden war. Geeicht wurde die Säule mit den Proteinmarkern Chymotrypsin A (MW 25.000), Cytochrom C (MW 12.800) und Insulin (MW 2.500 bzw. 3.500). Es wurde nicht automatisch fraktioniert, sondern die Peakspitzen wurden per Hand gesammelt und sofort auf Colicin M-Aktivität getestet.

Variationen mit der SDS-Konzentration von 0,2 - 0,01 % im Elutionspuffer ergaben, daß bei 0,05 % noch eine akzeptable Trennung erreicht werden konnte und die Colicin M-Aktivität nicht sofort zerstört wurde.

2.2.9.4 Trennung von ungespaltenem Colicin M und Colicin M-Fragmenten mittels einer Bio-Gel P30-Säule

Die Äquilibrierung der P30-Säule (0,9 x 53 cm) erfolgte mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0, die Fließgeschwindigkeit betrug 25 ml/Std. Aufgetragen wurden etwa 5 mg Colicin M in einem Volumen von 8 ml. Die Trennung wurde mit einem Photometer bei 230 nm verfolgt.

2.2.9.5 Trennung von ungespaltenem Colicin M und Colicin M-Fragmenten mittels einer CMC52-Säule

Zur Äquilibrierung der Säule (V = 20 ml) wurde ein 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 verwendet, der 0,02 % NaN_3 enthielt, die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml/Std.

Aufgetragen wurden 2-8 ml, in denen sich bis zu 15 mg Protein befanden. Bevor der 400 ml NaCl-Gradient von 0,0 bis 0,3 M angelegt wurde, wurde noch mit 100 ml Puffer gewaschen. Die Trennung wurde mit einem Photometer bei 254 nm verfolgt. Es wurden Fraktionen von 5 ml/Std. gesammelt. Der Säulenlauf wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

2.2.9.6 Trennung von Colicin M-Fragmenten mittels einer CM50- und SE50-Sephadex-Säule

Es wurden jeweils Säulen mit einem Volumen von 20 ml benutzt. Zur Äquilibrierung der CM50-Säule diente ein 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 bzw. pH 7,0, für die SE50-Säule ein 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0. Aufgetragen wurden Colicin M-Fragmente (aus der CMC52-Säule), die zuvor gegen den jeweiligen Puffer dialysiert wurden. Nach Auftragen der Proben wurde mit 100 ml Puffer nachgewaschen und mit einem 400 ml NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml/Std. und die Trennung wurde mit einem Photometer bei 254 nm verfolgt. Der Säulenlauf wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

2.2.9.7 Trennung von Colicin M-Fragmenten mittels einer DEAE-Sephadex-Säule

Das Volumen der benutzten Säule betrug 3 ml. Zur Äquilibrierung wurde ein 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 benutzt. Aufgetragen wurden Colicin M-Fragmente (aus CMC52-Säule), die zuvor eingeengt (Polyäthylenglykol) und gegen den benutzten Puffer dialysiert wurden. Nach Auftragen der Probe wurde mit 100 ml Puffer gewaschen und danach der 400 ml NaCl-Gradient von 0 bis 1 M angelegt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml/Std. und die Trennung wurde mit einem Photometer bei 254 nm verfolgt. Der Säulenlauf wurde bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

2.2.9.8 Schnellmethode zur Isolierung von Colicin B (53)

Benutzt wurden Rohextrakte von E. coli C1139 bzw. DR 855, die durch den unter 2.2.9.1.2 beschriebenen Säulenlauf Colicin M bzw. Pro-Colicin M-frei waren. Diese Rohextrakte (10 ml) wurden einer 30 % Ammoniumsulfatfällung unterworfen. Der Überstand wurde mit 50 % Ammoniumsulfat gefällt, in 5 ml 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,1 gelöst und im "batch"-Verfahren mit dem Anionenaustauscher DE52-Cellulose (Whatman) behandelt, der zuvor mit dem gleichen Puffer äquilibriert worden war.

Der Ionenaustauscher wurde in einer Glasfritte mehrmals gewaschen, und zwar zunächst mit 20 mM, danach mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer. Eluiert wurde Colicin B mit 150 mM Natriumphosphat-Puffer. Die Reinheit wurde mittels Gel-Elektrophorese überprüft.

2.2.10. Proteolytische Spaltung von Colicin M mit verschiedenen Proteasen

2.2.10.1 Spaltung mit Trypsin

Colicin M wurde mit Trypsin gespalten und die Spaltung mit Trypsin-Inhibitor nach 1/2 Std. bis 24 Std. gestoppt. Die Reaktion wurde mit einem Enzym/Substrat Verhältnis on 1:40 bei pH 8,5 (Äthylmorpholinacetatpuf-

fer 0,05 m) und 37°C durchgeführt. Der Verdau wurde mittels Gel-Elektrophorese und Colicin M-Aktivitätstest überprüft.

2.2.10.2 Spaltung mit Aminopeptidase M

Die Spaltungen von Colicin M mit Aminopeptidase M wurden alle bei pH 8,0 durchgeführt indem zu Colicin- und Enzym-Lösung Natriumphosphat-Puffer bis zu einer Gesamtkonzentration von 50 mM gegeben wurde. Das Enzym/Substrat Verhältnis lag je nach Versuch bei 1:30 bis 1:50. Die Reaktion wurde bei 37°C durchgeführt, die Inkubationszeit betrug 1 bis 30 Std. Gestoppt wurde der Verdau durch Zugabe von Aceton. Vor der Aceton-Zugabe wurden Colicin M-Aktivitätstests durchgeführt und die Spaltprodukte mittels HPLC (2.2.9.3) getrennt. Die mit Aceton gefällten Spaltprodukte wurden gelelektrophoretisch untersucht.

2.2.10.3 Spaltung mit Chymotrypsin A_4

Die Spaltung von Colicin M mit Chymotrypsin A_4 wurde wie unter 2.2.10.3 beschrieben bei pH 8,0 durchgeführt. Das Enzym/Substrat Verhältnis betrug 1:100. Gestoppt wurde der Verdau (37°C) nach 1/2 Std. bis 8 Std. durch Zugabe von Aceton. Vor der Aceton-Zugabe wurden Colicin M-Aktivitätstests durchgeführt. Die mit Aceton gefällten Spaltprodukte wurden gelelektrophoretisch untersucht.

2.2.10.4 Spaltung mit Proteinase K

Die Spaltung von Colicin M mit Proteinase K wurde auf zwei verschiedenen Wegen durchgeführt:

a) Bei pH 8,0 mit Natriumphosphat-Puffer 50 mM.

Enzym/Substrat Verhältnis zwischen 1:100 und 1:1.000
Inkubationstemperatur 37°C
Inkubationszeit 1/4 Std. bis 2 Std.

Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von Aceton. Vor der Acetonzugabe wurden Colicin M-Aktivitätstests durchgeführt und zum Teil die Spaltprodukte mittels HPLC (2.2.9.3) getrennt. Wurden die Spaltprodukte präparativ-säulenchromatographisch getrennt, wurde die Reaktion mit PMSF gestoppt. Die mit Aceton gefällten Spaltprodukte wurden gelelektrophoretisch untersucht.

b) Bei pH 6,0 direkt in den Colicin M-Lösungen, aus denen zuvor NaCl herausdialysiert wurde.

Enzym/Substrat Verhältnis 1:100
Inkubationstemperatur 4°C
Inkubationszeit 2 Std.

Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von PMSF (10 µM). Danach wurden die Colicin M-Bruchstücke und ungespaltenes Colicin M voneinander auf einer CMC52-Säule (2.2.9.5) getrennt.

2.2.11 Schutz von Zellen vor Colicin M und dem Phagen T5 durch Colicin M-Bruchstück B und Pro-Colicin M

2.2.11.1 Überprüfung mit Hilfe der Lebendzellzahl

Sowohl der Reaktionsansatz (100 µl) als auch die anschließende Verdünnungsreihe wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Teststamm wurde AB 2847 benutzt, der in der logarithmischen Phase geerntet, 3mal mit PBS gewaschen und dann in PBS so aufgenommen wurde, daß die OD 0,5 betrug.

50 µl dieser Zellsuspension ($2,5 \times 10^7$ Zellen) wurden mit 10 µl Colicin M-Bruchstück B-Lösung und 30 µl PBS bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach 30 Min. wurden 10 µl einer Colicin M-Verdünnung oder 10 µl einer

T5 Phagenverdünnung zugegeben, weitere 20 Min. inkubiert und dann nach Verdünnung auf Überlebende ausgestrichen. Kontrollen wurden so durchgeführt, daß statt der Colicin M-Bruchstück B-Lösung entweder Puffer (20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl pH 6,0) oder RSA-Lösung (1 mg/ml) benutzt wurde, statt der Colicin M-Lösung 0,1 % Tritonlösung und statt der Phagenverdünnung Saline.

2.2.11.2 Überprüfung mit Hilfe des Biophotometers

Das Reaktionsgefäß bei dem benutztem Biophotometer hat ein Volumen von ungefähr 10 ml. Dieses Gefäß wurde mit 7 ml TY-Medium, 0,7 ml 0,1 proz. Tritonlösung und 0,1 ml einer Übernachtkultur des Stammes AB 2847 beschickt. Bei Erreichen einer OD von 0,4 (3 x 10^9 Zellen) wurde eine bestimmte Menge Colicin M-Bruchstück B oder Pro-Colicin M zugegeben und nach weiteren 10 Min. Colicin M-Lösung oder T5-Phagenverdünnung. Auf dem Photometer konnte man die Entwicklung der optischen Dichte verfolgen.

2.2.12 Behandlung von osmotisch geschockten Zellen mit Colicin M-Bruchstück B und Pro-Colicin M (9)

Als Teststamm diente P8 und zu Kontrollzwecken die beiden Stämme Mo6 und C1139. Der Stamm wurde in 100 ml TY-Medium bis zu einer OD von 0,5 gezüchtet, die Zellen abzentrifugiert und das Sediment in 8 ml Puffer (0,01 M Tris/HCl 0,03 M NaCl pH 7,0) suspendiert. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert und der Waschvorgang wiederholt. Dann wurden die Zellen in 4,5 ml 33 mM Tris/HCl pH 7,0 aufgenommen und davon je 1 ml in Reagenzgläser gegeben. Zu den Zellen, die geschockt werden sollten, wurde 1 ml 40 % Saccharoselösung in 33 mM Tris/HCl pH 7,0 gegeben, zu den anderen Zellen nur 1 ml 33 mM Tris/HCl pH 7,0 ohne Saccharose. Dies wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach kräftigem Schütteln wurden die Zellen abzentrifugiert und in je 2 ml eisgekühlter 0,5 mM $MgCl_2$-Lösung aufgenommen, in der 10 µg Colicin M, Colicin M-Bruchstück B oder Pro-Colicin M gelöst waren. Nach Inkubation von 15 Min. im Eis wurde mit PBS verdünnt und auf TY-Platten auf Überlebende ausgestrichen.

2.2.13 Genetische Methoden: Mu(Ap,lac)-Mutationen auf dem ColM Plasmid

2.2.13.1 Konjugation des ColM Plasmids

Das ColM Plasmid aus dem Stamm C1139 wurde für die Mu-Mutagnese in den K12 Stamm KH 1422 konjugiert. Selektioniert wurde auf Streptomycin (100 µg/ml) und Colicin B.

Die erhaltenen Mutanten wurden mit dem Überschichtungstest auf Colicin M- und Colicin B-Produktion überprüft. Dieser Test wird so durchgeführt, daß die zu prüfenden Kolonien auf eine TY-Platte überimpft wurden und bei 37°C 24 Std. inkubiert wurden. Danach wurden die Kolonien über Chloroform lysiert und mit 3 ml TY-Top-Agar, in dem sich 0,1 ml des Indikatorstammes befindet, überschichtet. Produziert die Kolonie Colicin M bzw. Colicin B, bildet sich ein Lysehof um die Kolonie. Die Mutante DR 870 wurde für die Mu-Mutagenese ausgewählt.

2.2.13.2 Mutagenese mit dem Phagen Mu(Ap,lac) (Transduction) (14)

Zunächst wurde ein Phagenlysat hergestellt. Dazu wurden 10 ml TY-Medium mit 0,1 ml einer Übernachtkultur des Stammes mal 315 (Mud2) angeimpft und bei 28 - 30 °C bis OD 0,1 angezogen. Zur Induktion des Phagen wurde die Kultur 20 Min. bei 42°C ohne Schütteln inkubiert, danach bei 37°C mit Schütteln bis zur Lyse weiter inkubiert (50 Min.). Nach Zugabe von 0,1 ml Chloroform wurde auf dem Vortex-Mixer durchgemischt, 5 Min. gewartet und abzentrifugiert. Das Phagenlysat wurde sofort weiterverwendet für die Transduction.

Zu 0,5 ml des Stammes DR 870 OD 1,0 wurde $MgSO_4$ 0,01 M, $CaCl_2$ 0,005 M und 50 µl des Phagenlysats gegeben. Zur Phagenadsorbtion wurde 20 Min. bei 28 - 30°C ohne Schütteln inkubiert. Danach Zugabe von 5 ml TY-Medium und Inkubation von 30 Min. bei 28 - 30°C mit Schütteln. Die Zellen wurden abzentrifugiert und noch 2mal mit TY-Medium gewaschen.

Um nur solche Mu-Mutanten zu finden, bei denen der Phage im ColM Plasmid inseriert ist, wurde eine Kreuzung durchgeführt. Als Rezipientenstamm diente DR 871, in den vorher das Plasmid pLM 44 transformiert wurde, das einen temperaturresistenten Repressor für den Phagen Mu(Ap,lac) trägt (20). Zur Kreuzung wurde die doppelte Menge Zellen des Rezipientenstammes zu den Zellen gegeben, die man bei der Transduction erhalten hatte. Diese Zellmischung wurde auf ein steriles Membranfilter aufgebracht, das auf eine TY-Platte gelegt wurde. Nach Inkubation über Nacht wurden die Kreuzungsprodukte in 2 ml TY-Medium aufgenommen. Selektioniert wurde auf Ampicillin (25 µg/ml) und Tetracyclin (25 µg/ml).

2.2.13.3 Suche nach Mutanten, die eine veränderte Colicin M-Aktivität besitzen

Die unter 2.2.13.2 erhaltenen Mutanten wurden nun einzeln auf Colicin M- und Colicin B-Aktivität geprüft. Dazu wurden je 15 Einzelkolonien auf eine TY-Platte überimpft und wie unter 2.2.13.1 beschrieben mit dem Überschichtungstest untersucht. Auf diese Art wurden 500 Kolonien getestet. Die Mu-Mutagenese und anschließende Suche nach ColM-Mutanten wurde mit dem Phagen Mud1 und Mud2 auch einmal im Rahmen eines Praktikumsversuchs durchgeführt, bei dem ebenfalls etwa 500 Kolonien getestet wurden. Die Mutanten, die in ihrer Colicin M-Aktivität beeinträchtigt waren, wurden wie unter 2.2.9.2 beschrieben weiter geprüft.

2.2.14 Aktivierung von Pro-Colicin M

2.2.14.1 Autoaktivierung

Wie der Name schon sagt, kann man zu dieser Selbstaktivierung nicht viel beitragen.

Es wurden Rohextrakte des Stammes DR 856 und DR 872 zum Teil mit Membrantrümmer im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur aufbewahrt. In bestimmten Abständen (1 Tag bis 4 Wochen) wurden Colicin M- zum Teil

auch Colicin B-Aktivitätstests durchgeführt.

2.2.14.2 Aktivierung mit verschiedenen Proteasen

Die Aktivierungsversuche wurden zum Teil mit im "batch"-Verfahren gereinigten (2.2.9.2), zum Teil mit nach der Methode 2.2.9.1.3 gereinigten Pro-Colicin M-Lösungen durchgeführt.

Folgende Proteasen wurden getestet:

Chymotrypsin A_4
Subtilisin
Trypsin
St. aureus Protease
Pronase
Aminopeptidase M

Die Pro-Colicin M-Lösungen wurden mit verschiedenen Proteasekonzentrationen entweder zwischen 10 Min. und 60 Min. inkubiert und dann Aktivitätstests gemacht, oder aber Pro-Colicin M-Lösung und Protease wurden direkt auf eine TY-Platte getropft, die vorher mit 3 ml TY-Top-Agar mit Indikatorbakterien beschichtet worden war.

2.2.14.3 Aktivierung mit Rohextrakten

Pro-Colicin M-Lösungen wurden mit verschiedenen Rohextrakten (mit Membrantrümmern) 1 Std. bis 24 Std. inkubiert und anschließend auf Colicin M-Aktivität getestet. Zum Einsatz kamen Rohextrakte der Stämme DR 861 und DR 863, die kein aktives Colicin M und Colicin B mehr produzieren. Um zu prüfen, ob die Aktivierung energieabhängig abläuft, wurde zu einem Teil der Ansätze 1 mM ATP zugegeben (34).

Ebenfalls wurde dieser Versuch mit Rohextrakten von Stämmen durchgeführt, die entweder nur Colicin M oder Colicin B oder Colicin V produzieren:

E. coli K12 R2.1	ColB
E. coli 32T 19	ColM
E. coli K12 WO 788	ColV

2.2.14.4 Aktivierung durch Kreuzung

Das mutierte Plasmid aus dem Stamm DR 856 soll mit Plasmiden zusammen kommen, die entweder nur Colicin B oder Colicin M oder Colicin V produzieren.

Um auf solche Mutanten zu selektionieren, die das mutierte ColM-Plasmid (Pro-Colicin M) und dazu noch das ColM- oder ColB- oder ColV-Plasmid tragen, müssen diese Stämme einen Marker tragen. Der Stamm E. coli K12 WO 788 ist schon Neomycin-resistent. Deshalb wurden die beiden Stämme E. coli K12 R2.1 und E. coli 32T 19 einer P1-Transduction mit dem Transposon Tn5 unterzogen (46). Selektioniert wurde auf Neomycin (30 µg/ml). Nun wurde der Stamm DR 856 mit den Stämmen

WO 788
R2.1::Tn5
32T 19::Tn5

gekreutzt wie unter 2.2.13.1 beschrieben und auf Ampicillin (25 µg/ml) und Neomycin (30 µg/ml) selektioniert. Von den Kreuzungsprodukten wurden sofort Rohextrakte hergestellt (2.2.9.1.1) und diese auf Colicin M- bzw. Colicin B-Aktivität geprüft.

2.2.14.5 Aktivierung mit Rattenleber-Mitochondrien

Pro-Colicin M sollte mit einer Mitochondrien-Fraktion aus Rattenleber aktiviert werden (19, 47). Zur Isolierung der Mitochondrien-Fraktion (43, 58) wurden 5 g Rattenleber in 40 ml 0,25 M Saccharose, 1 mM Tris/HCl pH 7,5 mit einem Potter homogenisiert. Das Homogenat wurde 1 Min. bei 3.200 xg und der Überstand 2 Min. bei 17.000 xg zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 5 ml 0,25 M Saccharose, 1 mM Tris/HCl pH 7,5 suspendiert, in denen 10 mg Digitonin gelöst waren. Diese Mischung wurde, nachdem sie 2 Min. im Eisbad geschüttelt worden war, mit 15 ml desselben Puffers versetzt und 5 Min. bei 19.000 xg zentrifugiert. Das Sediment wurde noch einmal in dem Puffer aufgenommen und der Waschvorgang wiederholt. Danach wurde das Sediment in 0,25 M Saccharose-Lösung aufgenommen und stellte die Mitochondrien-Fraktion dar.

Je 100 µl Pro-Colicin M-Lösungen wurden mit der Mitochondrien-Fraktion (10 µl - 200 µl) 1 Std. bei 27°C inkubiert und anschließend Colicin M-Aktivitätstests gemacht.

2.2.14.6 Aktivierung durch eine Signalpeptidase (61, 68)

Aus 10 g tiefgefrorener Zellen E. coli K12 von Merck wurde eine Triton X-100 lösliche Membranfraktion gewonnen, in der die Signalpeptidase angereichert wurde (72). Die Zellen wurden in 10 ml 10 % Saccharose 50 mM Tris/HCl pH 7,5 suspendiert und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorene Zellsuspension wurde in 30 ml Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,5, 5 mM EDTA, 20 % Saccharose) aufgenommen und noch 6 mg Lysozym und 0,6 mg DNase I zugegeben. Diese Mischung wurde für 30 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann die Membranfragmente durch Zentrifugation (30 Min. 40.000 xg) bei 4°C gewonnen. Das Sediment wurde in 10 ml Puffer (10 % Glycerin, 10 mM Triäthanolamin pH 7,5) suspendiert und noch einmal für 30 Min. bei 40.000 xg zentrifugiert. Die Membranfraktion wurde in 10 ml Puffer (1 % Triton X-100, 10 % Glycerin, 10 mM Triäthanolamin pH 7,5) gut homogenisiert und 1 Std. bei 40.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand stellt den Triton X-100-Extrakt dar, mit dem Pro-Colicin M aktiviert werden sollte.

Dazu wurden Pro-Colicin M-Lösungen mit verschiedenen Mengen der Membranfraktion zwischen 1 Std. bis 8 Std. bei 37°C inkubiert und anschließend Colicin M-Aktivitätstests gemacht.

2.2.15 Überprüfung der Mu(Ap,lac)-Mutanten durch Kreuzung

Es sollte kontrolliert werden, ob die Mutanten noch den Phagen Mu(Ap,lac) im ColM, B-Plasmid inseriert haben. Dazu wurden folgende Mutanten mit dem Stamm ZI 397 gekreuzt:

DR 855, DR 856, DR 858, DR 859, DR 863, DR 869.

Die Kreuzung wurde wie unter 2.2.13.2 beschrieben durchgeführt. Selektioniert wurde auf Ampicillin (25 µg/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Die Kreuzungsprodukte aus den Kreuzungen

DR 855/ZI 397
DR 856/ZI 397 = DR 872
DR 869/ZI 397

wurden noch näher untersucht, indem Rohextrakte hergestellt wurden (2.2.9.1.1). Diese Rohextrakte wurden im "batch"-Verfahren gereinigt (2.2.9.2) und gelelektrophoretisch untersucht.

2.2.16 Immunchemische Methoden

2.2.16.1 Gewinnung von Antiserum gegen Colicin M

Gereinigtes Colicin M aus E. coli C1139 diente zur Immunisierung zweier Kaninchen. Eine Emulsion aus Colicin M-Lösung (1 mg/ml) und Freundschem Adjuvans wurde zu gleichen Teilen in die vier Achselhautfalten injiziert. Zur Erstimmunisierung wurden je 0,6 mg Colicin M eingesetzt, zur Zweitimmunisierung nach zwei Wochen und noch einmal zwei Wochen später je 0,8 mg Colicin M. Bei der Zweit- und Drittimmunisierung wurde Blut aus der Ohrvene entnommen, das Serum nach der Gerinnung abgetrennt, von restlichen Blutzellen befreit und in Portionen zu 0,5 ml bei -20°C eingefroren.

2.2.16.2 ELISA (64)

Mit diesem Verfahren wurden nicht nur die Colicin M- und Colicin B-Antikörper getestet, sondern auch immunchemische Kreuzreaktionen zwischen Colicin M und Pro-Colicin M durchgeführt.

Substratpuffer:

Glycin		0,1 M	|	mit deion. Wasser auf
$MgCl_2$	1 ml	1,0 M	|	1 l auffüllen und mit
$ZnCl_2$	1 ml	0,1 M	|	1 N KOH auf pH 10,5
			|	einstellen

Verfahren:

Je 200 µl Proteinlösung in PBS werden in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Falcon Div. Becton, Dickinson and Co. Nr. 3040-50) gefüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird mit PBS mit 0,05 % Triton X-100 gründlich gewaschen (3mal wiederholen). Die Flüssigkeitsreste sol-

len jedesmal gut ausgeschüttet werden.

Je 200 µl einer geeigneten Verdünnung Antiserum, verdünnt in PBS und 1 % RSA, werden eingefüllt und bleiben in der abgedeckten Platte 2 Std. bei Raumtemperatur stehen. Danach wird mit PBS-Triton gewaschen wie oben.

Nach 2 Std. Inkubation bei Raumtemepratur mit Ziegen-anti-Kaninchen-IgG, an das alkalisch Phosphatase gekoppelt ist (200 µl, 1:3.200 verdünnt in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 + 1 % RSA), wird nochmals gewaschen.

In die Vertiefung füllt man nun 200 µl Substratlösung (p-Nitro-Phenylphosphat 1 mg/ml, gelöst in Substratpuffer), inkubiert bei Raumtemperatur und beendet die Reaktion mit 50 µl 3 M NaOH. Die Extinktion wird in einem Photometer (Titertek Multiskan) bei 405 nm gemessen.

Es wurden verschiedene Colicin M- und Colicin B-Antikörperkonzentrationen getestet. Eine Verdünnung von 1:50.000 erwies sich für die Colicin M-Antikörper als günstig, für die Colicin B-Antikörper wurde eine Verdünnung von 1:1.000 gewählt.

Die Colicin M- und Pro-Colicn M-Lösungen, die Rohextrakte der Stämme DR 856, DR 869 und DR 859 (2.2.9.1.1) sowie die nach 2.2.9.8 grob gereinigten Colicin B- und "Pro-Colicin B"-Lösungen der Stämme C1139 und DR 855 wurden so verdünnt, daß die Konzentration des zu bestimmenden Colicins ungefähr 0,1 - 1,0 µg/ml betrug.

2.2.16.3 Gelblotting und anschließend ELISA auf der Nitrocellulose-Folie (62)

Blot-Puffer:

Tris	12,1 g	mit deion. Wasser auf 4 l auffüllen
Glycin	57,7 g	
Methanol	20 %	

Substratlösung:

3-Amino-9-Äthyl-Carbazol 80 mg in 10 ml Diäthylformamid. Davon 0,5 ml in 8,5 ml 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 + 10 µl 30 % H_2O_2 + 1 ml 2 % Agar. Mit diesen 10 ml wird eine "Substratplatte" gegossen.

Colicin B-Grobreinigungen (2.2.9.8) und mit Colicin B-Antikörper gefällte Rohextrakte der Stämme C1139 und DR 855 wurden mit Gelelektrophorese-Auftragspuffer (2.2.8.1) mit und ohne Merkaptoäthanol gekocht und auf ein Polyacrylamidgel 11 % (2.2.8.1) aufgetragen. Alle Proben wurden doppelt aufgetragen, um später die Hälfte der Nitrocellulose-Folie mit Amidoschwarz anzufärben. Nachdem die Gelelektrophorese beendet war, wurde das Gel auf die Nitrocellulose-Folie aufgebracht. Gel und Nitrocellulose-Folie wurden nun von oben nach unten mit Filterpapier Whatman 3MM und mit einem Scotch brite (3 M) eingepackt. Nitrocellulose-Folie, Filterpapier und Scotch brite waren vorher gut in Blot-Puffer getränkt worden. Der Blot-Sandwich wurde in die Blot-Apparatur (Bio Rad) gestellt, die vorher mit Blot-Puffer gefüllt worden war. Geblottet wurde 3 Std. bei 4°C und 36 V. Danach wurde ein Teil der Folie mit 1 % Amidoschwarzlösung gefärbt und nach 30 Min. mit 7 % Essigsäure entfärbt, der andere Teil wurde über Nacht in PBS mit 1 % RSA bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 3mal mit PBS gewaschen und mit Colicin B-Antikörper (1:50 verdünnt in PBS) inkubiert. Um wenig Antikörper zu verbrauchen, wurde die Nitrocellulose-Folie und die Antikörperlösung (2 ml) in eine Plastikfolie eingeschweißt. Nach 3 Std. wurde gründlich mit PBS mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen (3 x 15 Min.) und weitere 3 Std. mit Meerrettichperoxidasekonjugat, das an Protein A gekoppelt ist, inkubiert. Auch diese Inkubation erfolgte in einer Plastikfolie. Dann wurde wieder wie oben mit PBS mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen und mit Filterpapier trocken getupft.

Die Nitrocellulose-Folie wird dann auf die frisch gegossene Substratplatte gelegt (etwa 10 Min. nach dem Gießen) und die Reaktion durch Abnehmen der Folie von der Substratplatte gestoppt. Die Nitrocellulose-Folie sollte nach der Reaktion sofort photographiert werden, da die Färbung der Banden nicht stabil ist.

2.2.16.4 Ouchterlony-Test (50)

Dieser Immundiffusionstest wurde in 1 proz. Agaroseplatten durchgeführt, indem mit einem Stempel kleine Löcher in die Agarose gestanzt wurden. In diese Löcher wurden verschiedene Konzentrationen von Colicin M- bzw. Colicin B-Antikörper gegeben sowie Colicin M, Pro-Colicin M oder Colicin B enthaltende Rohextrakte.

Die Platten wurden 2 Tage im Kühlraum stehen gelassen und dann auf Präzipitationslinien untersucht.

2.2.17 In vitro Colicin M-Aktivitätstest

Dieser Test wurde von Herrn Dr. J.V. Höltje am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen durchgeführt (56).

Getestet wurden mehrere Colicin M-Lösungen aus verschiedenen Aufarbeitungen, Pro-Colicin M sowie verschiedene Colicin M-Bruchstücke aus Proteinase K-Spaltungen (2.2.10.4), vor allem Colicin M-Bruchstück B.

Die Proben wurden durch Konzentrieren mit Polyäthylenglykol und durch Dialyse auf die nötige Konzentration und den nötigen Puffer gebracht. Als Puffer diente: 10 mM Natriumphosphat pH 6,0, 150 mM NaCl, 0,02 % NaN_3, mit oder ohne 0,1 % Triton X-100.

2.2.18 Sequenzierung des NH_2-Terminus (16, 71)

Diese Sequenzierung wurde von Frau Dr.B. Wittmann-Liebold am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin durchgeführt.

Sequenziert wurden Colicin M, Pro-Colicin M und Colicin M-Bruchstück B.

Die Proteinlösungen wurden vorher durch Dialyse gegen 5 % Essigsäure entsalzt und lyophilisiert.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung von Colicin M

Da die vorhandenen gereinigten Colicin M-Lösungen (isoliert von K. Schaller) nicht ausreichten, mußte neues Colicin M isoliert werden. Dafür wurden 200 g gefrorene Zellen des Stammes E. coli C1139 wie unter 2.2.9.1.1 beschrieben behandelt und auf eine CMC52-Säule gepumpt (2.2.9.1.2). Aufbewahrt wurden die Hauptfraktionen 361 bis 371, was einer Menge von ungefähr 100 mg Colicin M entsprach.

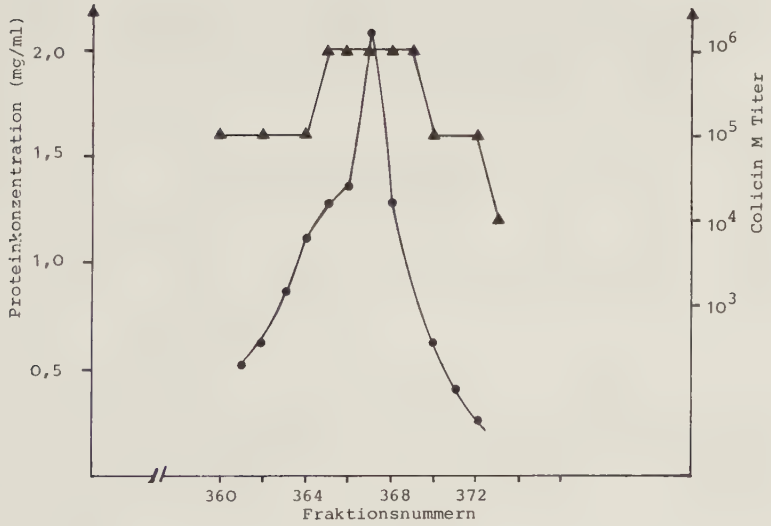


Abb. 2: Reinigung von Colicin M mit einer CMC52-Säule.
Proteinkonzentration (●); Colicin M-Aktivität (▲).

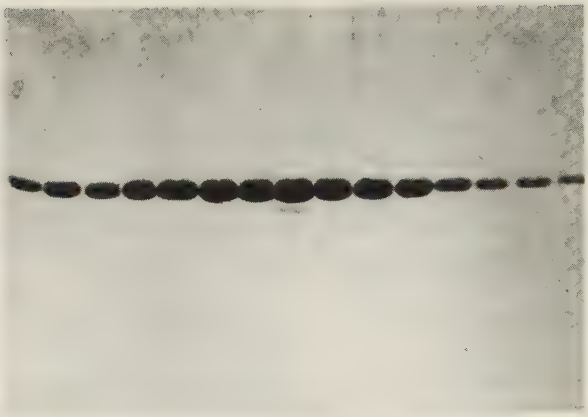


Abb. 3: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von den Hauptfraktionen der Colicin M-Isolierung aus der CMC52-Säule (17 % Gel). Von links nach rechts wurden die Fraktionen 360-374 aufgetragen.

3.2 Sequenzierung des NH_2-Terminus von Colicin M

Der NH_2-Terminus von Colicin M wurde von Frau B. Wittmann-Liebold an zwei verschiedenen Colicin M-Proben bestimmt.

1. Bestimmung

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Met-	Glu-	Thr-	Leu-	Thr-	Val-	Arg-	Ala-	Pro-		-Pro-	Thr-	Thr-	Asn-	Leu-	Pro-	Asp-

18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tyr-	Gly-	Asn-		-Ala-	Phe-	Leu-	Leu-		-Ala-		-Val-	Val
	Thr				Lys	Ser						Met

2. Bestimmung

```
 1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17
Met-Glu-Thr-Leu-Thr-Val-Arg-Ala-Arg-Cys-   -Ser-Thr-Asn-Leu-Thr-Ser-
                        His     His Ser

18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34
Tyr-   -   -Glu-Ala-Phe-   -Leu-   -Ala-Ala-   -Met-   -   -Ala-   -
            Gly
            Gln

35  36  37  38  39  40  41
   -Leu-Leu-   -   -Val-Val-
                   Thr
```

Vergleicht man die beiden Bestimmungen, fällt auf, daß die 3 Prolinreste der 1. Bestimmung in der 2. Bestimmung nicht mehr gefunden wurden. Eine persönliche Mitteilung von Frau Wittmann-Liebold ergab später dafür eine Erklärung, da in der Zeit, in der die 2. Bestimmung von Colicin M durchgeführt wurde, ein Programm für die Sequenzierung benutzt wurde, bei dem Prolin nicht gefunden werden konnte. Kombiniert man die zwei Bestimmungen mit einer Aminosäureanalyse von Colicin M-Bruchstück A (3.4.1), so ergibt sich folgender NH_2-Terminus:

```
 1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17
Met-Glu-Thr-Leu-Thr-Val-His-Ala-Pro-Cys-Pro-Ser-Thr-Asn-Leu-Thr-Ser-

18  19  20  21  22  23  24  25  26  27
Tyr-Gly-Asn-Glu-Ala-Phe-Ser-Leu-   -Ala-
```

3.3 Proteolytische Spaltung von Colicin M mit verschiedenen Proteasen

Colicin M sollte mit verschiedenen Proteasen so gespalten werden, daß man kleinere Bruchstücke erhält, die noch Colicin M-Aktivität besitzen. Durch Charakterisierung dieser Bruchstücke sollten die Funktionsdomänen von Colicin M bestimmt werden. Die größte Schwierigkeit bei diesen Versuchen stellte die vollständige Trennung von ungespaltenem Colicin M und Colicin M-Bruchstücken dar. Denn nur wenn es vollständig gewährleistet war, daß kein ungespaltenes Colicin M mehr in dem proteolytischen Reaktionsgemisch vorhanden war, konnte man gefundene Colicin M-Aktivitäten kleineren Bruchstücken zuschreiben.

3.3.1 Spaltung mit Trypsin

Ein partieller proteolytischer Verdau von Colicin M mit Trypsin wurde unter den unter 2.2.10.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

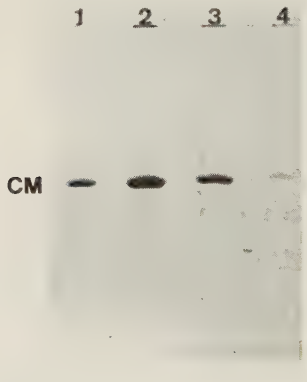


Abb. 4: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Colicin M-Spaltungen mit Trypsin (17 % Gel). Enzym/Substrat Verhältnis 1:40. Die Reaktion wurde mit Trypsin-Inhibitor im Verhältnis 1:1 zu Trypsin gestoppt.
Spur 1: ungespaltenes Colicin M
Spur 2: 2 Std. Inkubation
Spur 3: 4 Std. Inkubation
Spur 4: 7 Std. Inkubation

Tabelle 1: Colicin M-Aktivitätstest von Colicin M-Spaltungen mit Trypsin bei 37°C. Enzym/Substrat Verhältnis 1:40.

	Inkubationszeit	Colicin M-Titer
Colicin M	-	10^5
Colicin M/Trypsin	2 Std.	10^4
Colicin M/Trypsin	4 Std.	10^4
Colicin M/Trypsin	7 Std.	10^2

Natives Colicin M wird von Trypsin erst nach mehreren Stunden gespalten. Wenn Colicin M einmal anverdaut ist, wird es anscheinend schnell vollständig abgebaut, da auf dem Gel (Abb. 4) keine Bruchstücke zu sehen sind. Die festgestellte Colicin M-Aktivität entspricht ungefähr der Menge Colicin M, die noch nicht gespalten ist.

3.3.2 Spaltung mit Aminopeptidase M

Die Spaltung von Colicin M mit Aminopeptidase M wurde wie unter 2.2.10.2 beschrieben durchgeführt. Aminopeptidase M-Spaltungen ergaben nie einen größeren Colicin M-Aktivitätsverlust, da bei jeder Spaltung noch ungespaltenes Colicin M vorhanden war. Im Gegenteil, es konnte nach etwa 5 bis 10 Std. Spaltung immer ein Anstieg der Aktivität festgestellt werden. Dieser Effekt konnte nicht geklärt werden.

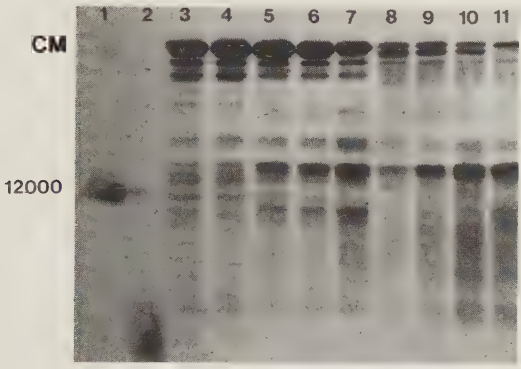


Abb. 5: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Colicin M-Spaltungen mit Aminopeptidase M (17 % Gel). Enzym/Substrat Verhältnis 1:30 von Spur 3-10 und 1:20 bei Spur 11.

Spur 1: Marker Cytochrom C
Spur 2: Marker Insulin
Spur 3: 30 Min. Spaltung
Spur 4: 1 Std.
Spur 5: 5 Std.
Spur 6: 7 Std.
Spur 7: 12 Std.
Spur 8: 17 Std.
Spur 9: 24 Std.
Spur 10: 30 Std.
Spur 11: 24 Std.

Tabelle 2: Colicin M-Aktivitätstest von Colicin M-Spaltungen mit APM bei 37°C. Enzym/Substrat Verhältnis 1:30.

	Inkubationszeit	Colicin M-Titer
Colicin M	-	5×10^4
Colicin M/APM	30 Min.	5×10^4
Colicin M/APM	1 Std.	10^4
Colicin M/APM	5 Std.	10^5
Colicin M/APM	7 Std.	5×10^4
Colicin M/APM	12 Std.	5×10^4
Colicin M/APM	17 Std.	10^4
Colicin M/APM	24 Std.	10^4
Colicin M/APM	30 Std.	5×10^4

Auf dem Gel (Abb. 5) kann man erkennen, daß sich bei der Spaltung von Colicin M mit Aminopeptidase M ein Spaltprodukt anhäuft, das ein Molekulargewicht von etwa 14.000 Dalton besitzt.

Um nun zu prüfen, ob dieses Spaltprodukt noch Colicin M-Aktivität besitzt, mußte es von ungespaltenem Colicin M abgetrennt werden. Dies wurde auf zwei verschiedenen Wegen versucht:

a) Flachbett-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ohne SDS (2.2.8.3).

b) HPLC-Trennung mittels TSK-Säule (2.2.9.3).

zu a) Colicin M wurde 24 Std. lang bei 37°C mit APM inkubiert bei einem Enzym/substrat Verhältnis von 1:20 und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke (10 mA), die Laufzeit betrug 8 Std.. Colicin M, das einen isoelektrischen Punkt von 9,5 besitzt (10), läuft bei einem pH-Wert des Elektrophoresepuffers von 8,3 in Richtung Kathode. Deshalb wurde nach Beendigung der Elektrophorese das Gelstück in Richtung Anode ausgeschnitten, mit 0,1 % Tritonlösung extrahiert und mit diesem Extrakt ein Colicin M-Aktivitätstest gemacht. Als Kontrolle diente ein Gelstück ohne Protein. Der Extrakt der APM-Bruchstücke hatte einen Colicin M-Titer von 50.

zu b) Eine Colicin M-Spaltung mit APM wurde auf eine HPLC-Säule TSK-Typ aufgespritzt.

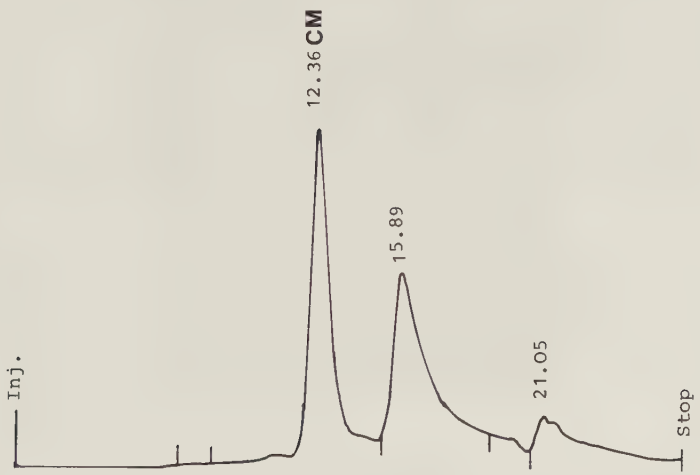


Abb. 6: Trennung von Colicin M und seinen Spaltprodukten nach APM-Spaltung. Enzym/Substrat Verhältnis 1:30, Inkubation 2 Tage bei 37°C. HPLC, TSK-Gel G3000 SW. Elution mit 50 mM Natriumphosphat pH 7,0 mit 0,05 % SDS.

Tabelle 3: Aktivitätstest von Colicin M und Colicin M-Bruchstücken nach HPLC-Trennung (APM-Spaltung 2 Tage bei 37°C). Enzym/Substrat Verhältnis 1:30.

	Colicin-Titer sofort nach Trennung	Colicin-Titer 5 Std. nach Trennung
Peak 12.36 Min. (Colicin M)	5×10^3	10
Kontrolle: ungef. 14.00 Min.	0	0
Peak 15.89 Min. (Bruchstück)	10^2	0

Die Kontrolle wurde zwischen den beiden Peaks bei etwa 14.00 Min. genommen.

Aus den Werten von Tabelle 3 kann erkennen, daß die Colicin M-Aktivität sowohl von Colicin M als auch von dem Bruchstück nach der Trennung sehr stark abfällt. Dies liegt höchstwahrscheinlich am SDS im Elutionspuffer. Versuche, SDS nach der Trennung mit Hilfe von Dowex-Anionenaustauscher 1 x 8 oder durch eine Kaliumphosphat-Fällung zu entfernen, schlugen fehl, zumindest trat keine Stabilisierung der Aktivitäten ein.

Das Molekulargewicht des APM-Bruchstückes aus Abb. 6 (15.89 Min.) betrug ungefähr 8.000 Dalton $\pm$ 2.000 (Eichung der TSK-Säule mit Markerproteinen s. 2.2.9.3).

3.3.3 Spaltung mit Chymotrypsin A_4

Spaltungen von Colicin M mit Chymotrypsin A_4 wurden wie unter 2.2.10.3 beschrieben durchgeführt.

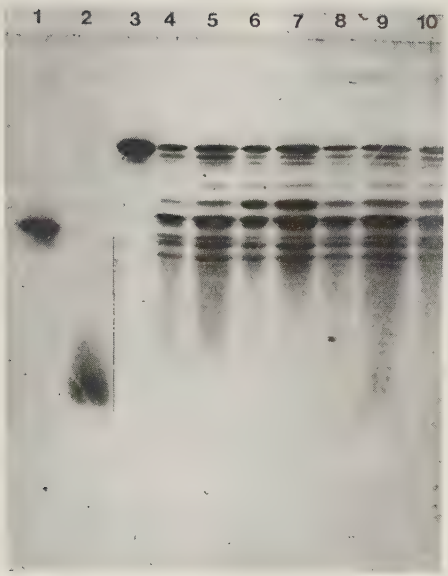


Abb. 7: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Colicin M-Spaltungen mit Chymotrypsin A_4 (17 % Gel). Enzym/Substrat Verhältnis 1:100 bei Spur 4 und 5 und 1:200 bei Spur 6 bis 10.
Spur 1: Markerprotein Cytochrom C
Spur 2: Markerprotein Insulin
Spur 3: ungespaltenes Colicin M
Spur 4 und 5: je 15 Min. Spaltung, 5 µl und 10 µl
Spur 6 und 7: je 15 Min. Spaltung, 5 µl und 10 µl
Spur 8 und 9: je 30 Min. Spaltung, 5 µl und 10 µl
Spur 10: 45 Min. Spaltung, 5 µl

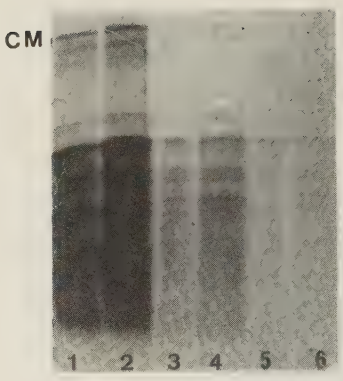


Abb. 8: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Colicin M-Spaltungen mit Chymotrypsin A_4 (17 % Gel). Enzym/Substrat Verhältnis 1:200.
Spur 1 und 2: 1 Std. Spaltung 15 µl und 25 µl
Spur 3 und 4: 5 Std. Spaltung 15 µl und 25 µl
Spur 5 und 6: 7 Std. Spaltung 15 µl und 25 µl

Tabelle 4: Colicin M-Aktivitätstest von Colicin M-Spaltungen mit Chymotrypsin A_4 bei 37°C.

	Enzym/Substrat Verhältnis	Inkubationszeit	Colicin-Titer
Colicin M	-		5×10^4
Colicin M/Chym. A_4	1:100	15 Min.	10^4
Colicin M/Chym. A_4	1:200	15 Min.	10^4
Colicin M/Chym. A_4	1:200	30 Min.	10^4
Colicin M/Chym. A_4	1:200	45 Min.	10^4
Colicin M/Chym. A_4	1:200	1 Std.	10^4
Colicin M/Chym. A_4	1:200	5 Std.	10^4
Colicin M/Chym. A_4	1:200	7 Std.	5×10^3
Colicin M/Chym. A_4	1:200	17 Std.	10
Colicin M/Chym. A_4	1:200	20 Std.	10

Auf dem Gel Abb. 8 kann man bei Spur 3 bis 6 keine Colicin M-Bande mehr erkennen, obwohl diese Proben noch sehr beachtliche Colicin M-Aktivitäten besitzen. Dies deutet stark darauf hin, daß einige Bruchstücke, die in einem Molekulargewichtsbereich von 6.000 bis 14.000 Dalton liegen, noch aktiv sind. Da jedoch die Colicin M-Spaltung mit Chymotrypsin A_4 zu viele verschiedene Bruchstücke lieferte, wurde die Trennung der Bruchstücke voneinander nicht weiter verfolgt.

3.3.4 Spaltung mit Proteinase K

Spaltungen von Colicin M mit Proteinase K wurden wie unter 2.2.10.4 beschrieben durchgeführt. Die Spaltungen bei pH 8,0 waren zunächst sehr erfolgversprechend, da Colicin M vollständig gespalten wurde (keine Colicin M-Bande auf dem Gel) und noch Colicin M-Aktivität bei den wenigen durch die Spaltung entstandenen Bruchstücken festgestellt werden konnte. Es gelang jedoch nicht, diese Spaltstücke voneinander zu trennen. Deshalb wurden die Spaltbedingungen geändert (pH, Inkubationszeit, Inkubationstemperatur, Enzym/Substrat Verhältnis). Auf diese Weise wurde eine kontrollierte, genau definierte Spaltung von Colicin M mit Proteinase K erreicht, bei der die Bruchstücke A und B entstanden, die durch einen einzigen Säulenlauf voneinander und von ungespaltenem Colicin M getrennt werden konnten.

3.3.4.1 Proteinase K-Spaltung bei pH 8,0

Colicin M-Lösungen wurden durch Zugabe von Natriumphosphat auf pH 8,0 eingestellt und mit Proteinase K inkubiert.

Abb. 9: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Colicin M-Spaltungen mit Proteinase K bei pH 8,0 (17 % Gel). Enzym/Substrat Verhältnis 1:120 bei Spur 3 und 4 und 1:600 bei Spur 5 bis 10. Die Inkubationstemperatur betrug 37°C.
Spur 1: Markerprotein Cytochrom C; Spur 2: Markerprotein Insulin
Spur 3 und 4: 5 Min. Spaltung, 5 µl und 10 µl
Spur 5 und 6: 10 Min. Spaltung, 5 µl und 10 µl
Spur 7 und 8: 20 Min. Spaltung, 5 µl und 10 µl
Spur 9 und 10: 30 Min. Spaltung, 5 µl und 10 µl
Spur 11: ungespaltenes Colicin M

Tabelle 5: Colicin M-Aktivitätstest von Colicin M-Spaltungen mit Proteinase K bei pH 8,0 und 37°C.

	Enzym/Substrat Verhältnis	Inkubations-zeit	Colicin-Titer
Colicin M	-	-	5×10^4
Colicin M/Proteinase K	1:120	5 Min.	10^4
Colicin M/Proteinase K	1:600	10 Min.	10^4
Colicin M/Proteinase K	1:600	20 Min.	10^4
Colicin M/Proteinase K	1:600	30 Min.	10^4

Auf dem Gel Abb. 9 ist die Colicin M-Bande fast vollständig verschwunden. Trotzdem bringen diese Proben eine fast genau so hohe Colicin M-Aktivität wie ungespaltenes Colicin M. Um nachzuweisen, daß die Aktivität wirklich auf den entstandenen Spaltprodukten beruht, wurden folgende Versuche gemacht:

a) Flachbett-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ohne SDS (2.2.8.3)
b) HPLC-Trennung mittels TSK-Säule (2.2.9.3)
c) Trennung auf einer P30-Säule (2.2.9.4)
d) Trennung auf einer CMC52-Säule (2.2.9.5)

zu a) Colicin M wurde mit Proteinase K bei pH 8,0 gespalten und auf ein Flachbett-Polyacrylamidgel ohne SDS aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gelstücke, auf denen sich Bruchstücke befanden, ausgeschnitten und Colicin M-Aktivitätstests gemacht, entweder durch Extrahieren der Bruchstücke oder aber durch direktes Auflegen der Gelstücke auf eine TY-Platte (2.2.8.3).

A

B

Abb. 10: Flachbett-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ohne SDS von Colicin M-Spaltungen mit Proteinase K bei pH 8,0. Die Laufzeit betrug 30 Std. bei einer Stromstärke von 10 mA. Enzym/Substrat Verhältnis 1:200.
Spur 1: 60 Min. Spaltung
Spur 2: 50 Min. Spaltung
Spur 3: 40 Min. Spaltung
Spur 4: 20 Min. Spaltung
Spur 5: ungespaltenes Colicin M

Auf dem Gel Abb. 10 kann man sehen, daß die Colicin M-Bande nach den Proteinase K-Spaltungen vollständig verschwunden ist und die entstandenen Bruchstücke in die Colicin M entgegengesetzte Richtung laufen.

Aus einem Gel, das unter den gleichen Bedingungen gewonnen wurde wie das Gel in Abb. 10, wurden Gelstücke (jeweils die ganze Spur vom Startpunkt bis A bzw. bei ungespaltenem Colicin M vom Startpunkt bis B) herausgeschnitten und mit 0,1 % Tritonlsöung extrahiert. In den Extrakten konnte, abgesehen von der Colicin M-Spur vom Startpunkt bis B, keine Coli-

cin M-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Aus demselben Gel wurde eine Spur (Colicin M-Spaltung mit Proteinase K bei pH 8,0, 30 Min., Enzym/Substrat Verhältnis 1:200) ausgeschnitten, auf eine TY-Platte aufgelegt und mit 3 ml Top-Agar überschichtet, in dem sich Indikatorbakterien befanden. Um das Gelstück bildete sich ein klarer Hof. Dies würde bedeuten, daß aktive Bruchstücke aus dem Gelstück diffundiert sind. Warum die 0,1 % Tritonextrakte inaktiv waren, konnte nicht geklärt werden.

zu b) Colicin M-Spaltungen mit Proteinase K bei pH 8,0 wurden auf eine HPLC-Säule TSK-Typ aufgespritzt.

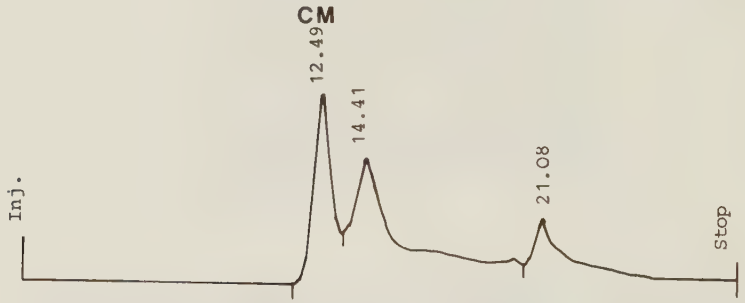


Abb. 11: Trennung von Colicin M und seinen Spaltprodukten nach Proteinase K-Spaltung. Enzym/Substrat Verhältnis 1:200 (15 Min. spaltung bei 4°C und pH 8,0). HPLC, TSK-Gel G3000 SW; Elution mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 mit 0,05 % SDS, 1 ml/Min.; Druck 25 bar.

Tabelle 6: Aktivitätstest von Colicin M und Colicin M-Bruchstücken nach HPLC-Trennung (Bedingungen s. Abb. 11).

	Colicin M-Titer sofort nach Trennung
Peak bei 12.49 Min. (Colicin M)	10^3
Peak bei 14.41 Min. (Bruchstück)	10^4

Das Molekulargewicht des aktiven Bruchstückes bei 14.41 Min. beträgt ungefähr 13.000 Dalton $\pm$ 2.000.

zu c) Colicin M-Spaltungen mit Proteinase K wurden im präparativen Maßstab durchgeführt und auf einer P30-Säule getrennt.

Mit dieser Säule gelang eine eindeutige Trennung von Colicin M und Colicin M-Bruchstücken, was man an der Zunahme der Colicin M-Aktivität ab Fraktion 60 sehen kann. Allerdings ist die Aktivität bei den Bruchstücken, gemessen an der Proteinmenge, um den Faktor 50 bis 100 geringer als bei intaktem Colicin M.

Die Fraktionen 34 (ungespaltenes Colicin M) und 66 wurden auf Colicin M-Aktivität in vitro getestet (2.2.17). Dabei wurde festgestellt, daß die in vitro-Aktivität der beiden Fraktionen gleich hoch ist. Dies bedeutet, daß die in vitro-Aktivität der Bruchstücke so groß ist wie bei intaktem Colicin M, die Aktivität gegenüber ganzen Zellen aber stark reduziert ist, was mit einem Fehlen der Domänen für Rezeptorbindung oder Translokation erklärt werden könnte.

Auf Abb. 12 kann man ebenfalls sehen, daß bei diesen Spaltbedingungen mehrere Bruchstücke entstehen. Die Trennung dieser Bruchstücke auf einer SE-50 Sephadex-Säule (2.2.9.6) gelang nicht. Die gesamte aufgetragene Proteinmenge (Fraktionen 64 -67) wurde nicht an die Säule gebunden.

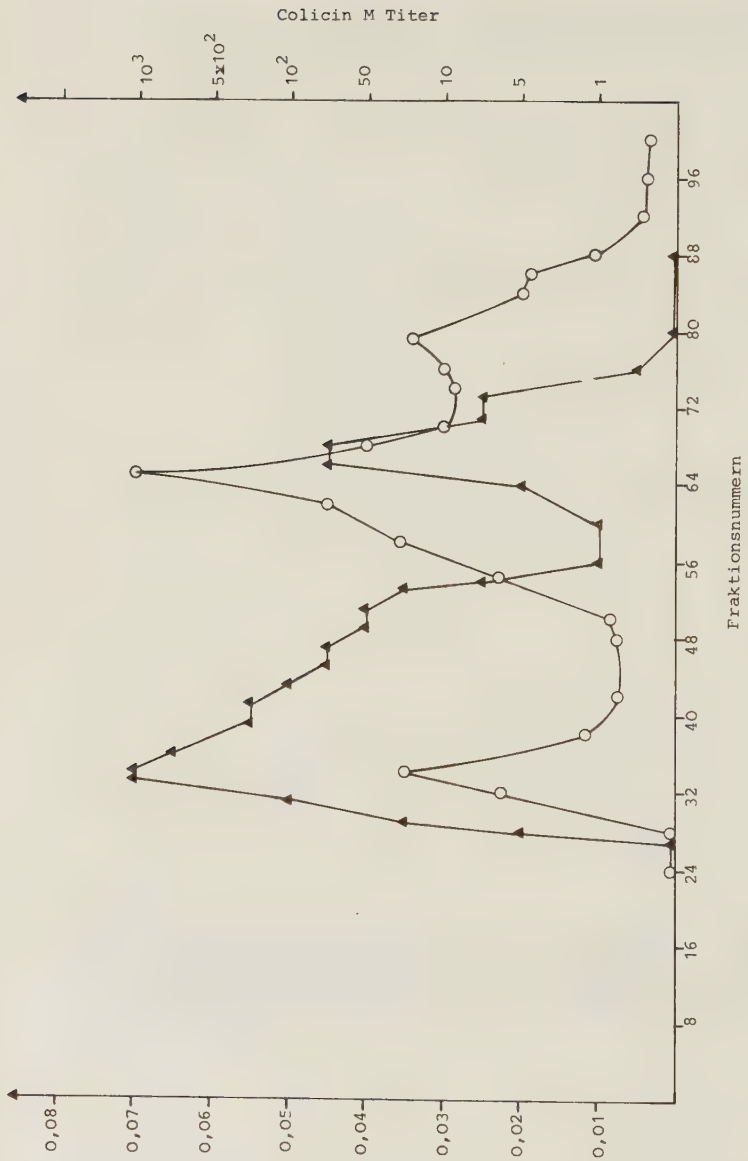


Abb. 12: Colicin M-Spaltung mit Proteinase K (2 Std. bei pH 8,0 und 4°C, Enzym/Substrat Verhältnis 1:100) und Trennung der entstandenen Spaltstücke von Colicin M auf einer P30-Säule. Die aufgetragene Menge betrug 5 mg Colicin M in 8 ml. Fließgeschwindigkeit 25 ml/Std. Fraktionen von 10 Min. (▲) Colicin M-Aktivität, (o) Extinktion bei 254 nm (Proteinmenge).

zu d) Da bei größeren Proteinmengen (Volumina) die Trennung auf der P30-Säule schlechter wurde, wurde Colicin M von Colicin M-Bruchstücken nach Proteinase K-Spaltung auf einer CMC52-Säule getrennt (2.2.9.5).

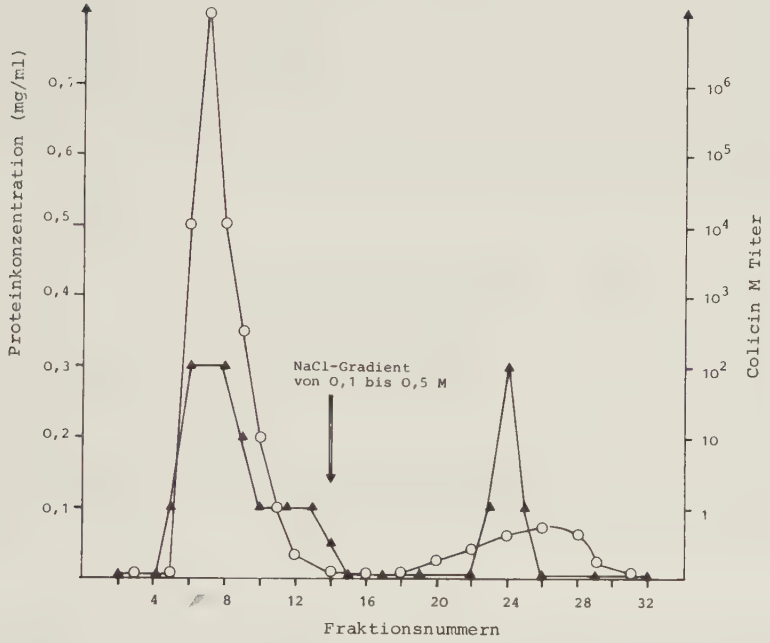


Abb. 13: Colicin M-Spaltung mit Proteinase K (2 Std. bei 4°C und pH 8,0, Enzym/Substrat Verhältnis 1:100) und Trennung der entstandenen Spaltstücke von Colicin M auf einer CMC52-Säule. Die aufgetragene Menge betrug 5 mg Colicin M in 8 ml. Fließgeschwindigkeit 5 ml/Std., Fraktionen von 1 Std.; ab Fraktion 14 NaCl-Gradient von 0,1 bis 0,5 M.
(o) Protein (mg/ml); (▲) Colicin M-Aktivität.

Die Bruchstücke (Fraktionen 5 - 10) konnten vollständig von ungespaltenem Colicin M (Fraktionen 23 - 25) abgetrennt werden. Auch war die Aktivität dieser Bruchstücke mit einem Colicin-Titer von 10^2 recht hoch.

Um die Bruchstücke voneinander zu trennen, wurden die Fraktionen 6 - 10 mittels Polyäthylenglykol auf 5 ml eingeengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule gegeben (2.2.9.7). Auch an diese Säule banden die Bruchstücke nicht. Ein Polyacrylamidgel mit SDS ergab, daß es sich mindestens um 4 Bruchstücke handelte mit einem Molekulargewicht zwischen 8.000 bis 14.000 Dalton. Da es nicht möglich war, diese Bruchstücke voneinander zu trennen, wurden die Proteinase K-Spaltbedingungen verändert und damit die Spezifität der Proteinase K.

3.3.4.2 Proteinase K-Spaltungen bei pH 6,0

Die Spaltungen von Colicin M mit Proteinase K bei pH 6,0 wurden direkt in den Colicinlösungen durchgeführt ohne vorher noch Puffer zuzugeben (2.2.10.4). Dabei entstehen die Bruchstücke A und B, die von ungespaltenem Colicin M und voneinander auf einer CMC52-Säule getrennt wurden (2.2.9.5). Diese Spaltungen mit anschließender Trennung auf der CMC52-Säule wurden mehrmals gemacht. An einem Beispiel sollen die Ergebnisse dieser Trennung näher erläutert werden.

16 ml Colicin M-Lösung (20 mg) wurden mittels Polyäthylenglykol auf 5 ml eingeengt und gegen 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 mit 0,02 % NaN_3 dialysiert. Dann wurde mit Proteinase K gespalten, die Reaktion mit PMSF gestoppt und auf die CMC52-Säule aufgetragen.

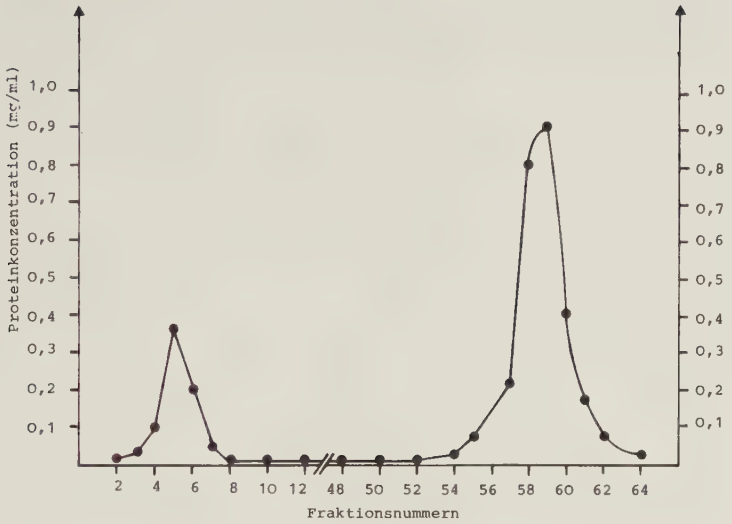


Abb. 14: Colicin M-Spaltung mit Proteinase K (2 Std. bei 4 °C und pH 6,0, Enzym/Substrat Verhältnis 1:100). Trennung auf einer CMC52-Säule. Fließgeschwindigkeit 5 ml/Std., Fraktionen von 1 Std; ab Fraktion 20 NaCl-Gradient von 0 bis 0,3 M.

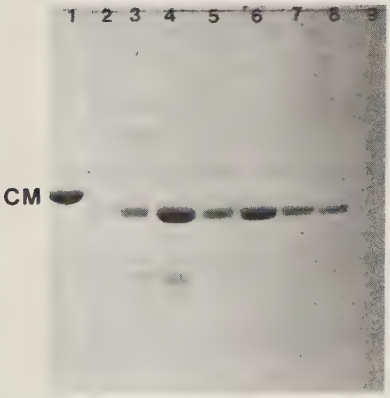


Abb. 15: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Fraktionen aus einer Trennung beschrieben unter Abb. 14 (17 % Gel).
Spur 1: ungespaltenes Colicin M
Spur 2 bis 8: Fraktionen 55 - 61
Spur 9: Frakton 5

Bei dieser Spaltung (beschrieben in Abb. 14 und 15) wird Colicin M fast vollständig in die 2 Bruchstücke Fraktionen 4 - 7 (Bruchstück A) und Fraktionen 56 - 62 (Bruchstück B) gespalten. Daß noch kleine Mengen ungespaltenes Colicin M vorhanden sind, sieht man an der Aktivität bei Fraktion 51 und 52. Bei Colicin M-Aktivitätstests von Fraktion 53 und 54 konnte ein seltsames Phänomen beobachtet werden. Der auf den Top-Agar aufgegebene Tropfen ergab keinen klaren Lysehof, sondern war in seinem Zentrum zugewachsen und um das Zentrum des Tropfens herum bildete sich ein dünner Lysestreifen. Dieses Phänomen konnte bei jeder Spaltung unter den gleichen Bedingungen zwischen Colicin-Peak und dem Bruchstück-Peak beobachtet werden. Da sich in diesen Fraktionen noch geringe Mengen an Colicin M und schon geringe Mengen Bruchstück B befinden, schützt das inaktive Bruchstück B Zellen vor aktivem Colicin M, wobei das kleinere Bruchstück weiter und leichter diffundieren müßte, was nicht der Fall ist. Eine Erklärung, warum dieses kleinere Peptid schlechter diffundiert, könnte die unterschiedliche Polarität und vor allem die unterschiedliche Ladung des Bruchstückes B zu Colicin M sein. Bruchstück B ist basischer als Colicin M und TY-Medium ist sauer.

Fraktion 5 (Bruchstück A) stellt ein oder auch mehrere Peptide dar, die mit Aceton nicht fällbar sind und auch in einem Polyacrylamidgel nicht fixierbar sind, da auf Spur 9 (Abb. 15) keine Proteinbande sichtbar ist.

3.3.5 Spaltung mit Carboxypeptidase A und B (COOH-terminale Bestimmung)

Die Bestimmung des COOH-Terminus folgte der Beschreibung 2.2.6. Zunächst wurde versucht, Colicin M mit Carboxypeptidase A zu spalten. Nachdem keine Aminosäure abgespalten werden konnte, wurde Carboxypeptidase B eingesetzt.

Es wurden 110 nM Colicin M gegen 0,1 M NaCl, 0,05 M N-Äthyl-Morpholinacetat pH 8,5 und 0,1 % Triton X-100 dialysiert. In den Dialyseschlauch wurden Carboxypeptidase B (Enzym/Substrat Verhältnis 1:50) und 25 nM

Norleucin gegeben und 10 Std. bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation wurde gegen 15 ml deion. Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend eingedampft, in Natriumcitratpuffer aufgenommen und mittels Aminosäureanalyse (2.2.7) bestimmt.

Die Dialyse von Norleucin betrug ungefähr 80 %.
Die Aminosäureanalyse ergab: 50 nM Arginin
25 nM Lysin

Als Kontrolle diente Wasser, das genau gleich wie die Colicin M-Probe behandelt wurde.

Da 110 nM Colicin M eingesetzt wurden, wurden sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Spaltung nur etwa 50 % umgesetzt. Damit sind Arg-Lys- die beiden COOH-terminalen Aminosäuren.

Während der Spaltung mit Carboxypeptidase B flockte Colicin M jedesmal aus. Spaltungen mit Colicin M und Carboxypeptidase B ohne Dialyse im Eppendorfcup ergaben dieselben Ergebnisse, nämlich, daß durch die Abspaltung der COOH-terminalen Aminosäuren Arginin und Lysin Colicin M destabilisiert und damit unlöslich wird.

3.4 Charakterisierung der Colicin M-Bruchstücke A und B

3.4.1 Charakterisierung von Bruchstück A

Die Untersuchungen von Bruchstück A gestalteten sich sehr schwierig, da es nur in geringen Mengen und stark verdünnt zur Verfügung stand. Eine Konzentrierung war wegen seiner geringen Größe nicht möglich. Und eine Entsalzung auf einer P2-Säule schlug ebenfalls fehl, da durch die Micellenbildung von Triton X-100 das Peptid von Triton nicht abgetrennt werden konnte.

Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei diesem Bruchstück A um ein oder um zwei Peptide handelt. Aminosäureanalysen dieser Fraktionen ergaben, daß das Peptid oder die Peptide den NH_2-Terminus von Colicin M darstellen.

Tabelle 7: Aminosäureanalyse von Bruchstück A (Fraktion 5 Abb. 14) im Vergleich zum NH_2-Terminus von Colicin M.

Aminosäuren	Bruchstück A	NH_2-Terminus von Colicin M
Asp	2	2
Thr	3	4
Ser	3	3
Glu	2	2
Gly	2	1
Ala	2	2
Val	2	1
Met	1	1
Ile	1	-
Leu	3	3
Tyr	1	1
Phe	-	1
Lys	-	-
His	1	1
Arg	-	-
Pro	2	2
Cys	1	1
	26 AS	25 AS

Es konnte ebenfalls festgestellt werden, daß Bruchstück A sowohl gegen ganze Zellen als auch im in vitro-System (2.2.17) völlig inaktiv ist.

3.4.2 Charakterisierung von Bruchstück B

Bruchstück B, das durch Proteinase K-Spaltung bei pH 6,0 aus Colicin M entsteht und noch basischer ist als Colicin M (auf der Kationenaustauschersäule CMC52 wird es durch den NaCl-Gradienten noch später als Colicin M eluiert) hat ein Molekulargewicht von 24.000 Dalton $\pm$ 1.000.

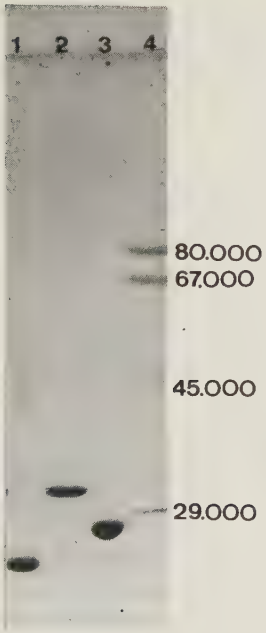


Abb. 16: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Bruchstück B (11 % Gel).
Spur 1: Bruchstück B
Spur 2: Pro-Colicin M
Spur 3: Colicin M
Spur 4: Markerproteine (Carboanhydrase 29.000, Ovalbumin 45.000, RSA 67.000, Human-Transferrin 80.000)

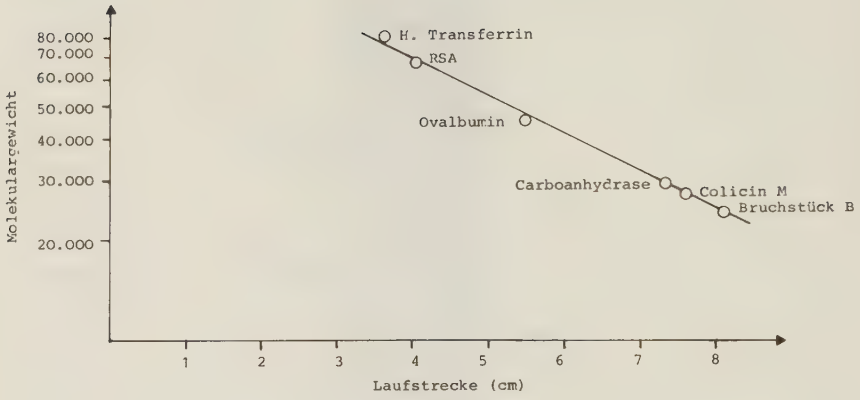


Abb. 17: Bestimmung des Molekulargewichtes von Bruchstück B (s. Abb. 16).

Da Bruchstück B gegen ganze Zellen völlig inaktiv war, sollte herausgefunden werden, welche Funktions-Domänen dieses Bruchstück noch besitzt und welchen Teil des Colicin M-Moleküls es darstellt.

3.4.2.1 Bestimmung des COOH-Terminus

Die Bestimmung des COOH-terminalen Endes von Bruchstück B sollte darüber Klarheit bringen, ob der COOH-Terminus von Bruchstück B identisch ist mit dem von Colicin M. Die COOH-terminalen Aminosäuren von Colicin M konnten bestimmt werden als Arg-Lys-. 80 nM Bruchstück B wurden gegen 0,05 % N-Äthylmorpholinacetat dialysiert und anschließend direkt im Dialyseschlauch mit Carboxypeptidase B (Enzym/Substrat Verhältnis 1:50) versetzt und 8 Std. bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation wurde gegen 15 ml deion. Wasser dialysiert (2.2.6).

Das Dialysat wurde eingedampft, in Natriumcitratpuffer aufgenommen und mittels Aminosäureanalyse (2.2.7) bestimmt.

Die Aminosäureanalyse ergab: 53 nM Arginin
34 nM Lysin

Bei eingesetzten 80 nM Bruchstück B war die Carboxypeptidase B-Spaltung effektiver als bei Colicin M. Damit beinhaltet das Bruchstück B noch den COOH-Terminus von Colicin M. Bruchstück B verhielt sich während der Spaltung genau so wie Colicin M, es flockte ebenfalls nach etwa 2 - 4 Std. aus. Auch dieses Ergebnis konnte wie bei Colicin M (3.3.5) im Eppendorfcup ohne Dialyse bestätigt werden.

3.4.2.2 Bestimmung der Rezeptorbindeaktivität

Der unter 3.3.4.2 beschriebene Effekt, daß geringe Mengen Colicin M und Bruchstück B zusammen bei Aktivitätstests einen Hemmkreis um das Zentrum des Tropfens ergeben, deutete darauf hin, daß das in vivo inaktive Bruchstück B noch Rezeptorbindeaktivität besitzt. Es sollte versucht werden, mit Hilfe von Bruchstück B Zellen sowohl vor aktivem Colicin M als auch vor dem Phagen T5, der denselben Rezeptor (fhuA) benutzt wie Colicin M, zu schützen.

Dies wurde auf zwei verschiedenen Wegen versucht:

a) Mit Hilfe der Lebendzellzahl (2.2.11.1)
b) Wachstumskurven mit dem Biophotometer (2.2.11.2)

zu a) $2{,}5 \times 10^7$ Zellen (AB 2847 behandelt wie unter 2.2.11.1 beschrieben) wurden mit ungefähr 10^{14} Molekülen Bruchstück B 30 Min. inkubiert, dann mit ungefähr 10^{10} Molekülen Colicin M bzw. 10^9 T5-Phagen versetzt und nach weiteren 20 Min. verdünnt und auf Überlebende ausgestrichen. Um unspezifischen Schutz zu bestimmen, wurden Zellen vor Colicin M- oder T5-Zugabe statt mit Bruchstück B mit RSA inkubiert.

Tabelle 8: Bestimmung der überlebenden Zellen nach Einwirkung von Colicin M oder T5-Phagen auf vorher mit Bruchstück B inkubierten Zellen des Stammes E. coli K12 AB 2847.

	Überlebende Zellen (%)	
	Colicin M	Phage T5
Schutz durch BB	77, 86, 48	50, 100, 97
Schutz durch RSA	12	2
kein Schutz	4, 3, 8	1, 6, 4

Aus den Werten der Tabelle 8 sieht man, daß die Zahl der Überlebenden stark schwankt. Dies liegt wahrscheinlich an den Verdünnungsreihen, die in der Mikrotiterplatte durchgeführt wurden und nicht exakt zu reproduzieren waren. Aber trotzdem kann man aus den Werten erkennen, daß Bruchstück B an die Zellen bindet und damit vor Colicin M und T5-Phagen schützt.

zu b) Bei Zugabe von Bruchstück B (Abb. 18 und 19) sind ungefähr 3×10^9 Zellen vorhanden, die mit 3×10^{14} Molekülen Bruchstück B vor etwa 3×10^{10} Molekülen Colicin M bzw. 5×10^9 T5-Phagen geschützt werden. Bruchstück B liegt also in einem überschuß von 10^4 gegenüber Colicin M bzw. 6×10^4 gegenüber der Zahl der T5-Phagen vor.

Das Ergebnis, das aus den beiden Abbildungen 18 und 19 ersichtlich ist, nämlich der Schutz von Zellen gegenüber Colicin M und den Phagen T5 durch das Bruchstück B, deckt sich mit dem Ergebnis, das unter 3.4.2.2 a) mit Hilfe der Lebendzellzahl herauskam.

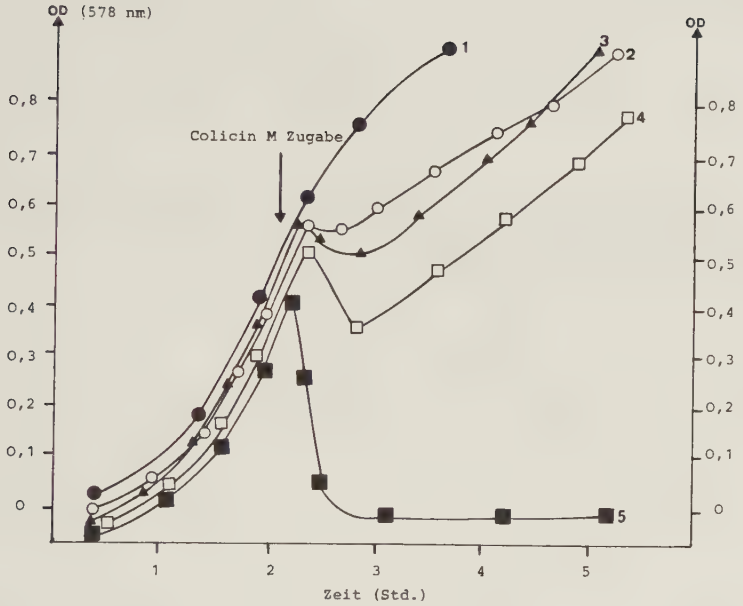


Abb. 18: Wachstumskurven von E. coli K12 AB 2847 bei 37°C im Biophotometer. Colicin M wurde jeweils 10 Min. nach Zugabe von Bruchstück B zugegeben.
Kurve 1 (●): kein Bruchstück B und kein Colicin M
Kurve 2 (○): Bruchstück B (3×10^{14} Moleküle) und Colicin M (2×10^{10} Moleküle)
Kurve 3 (▲): Bruchstück B (3×10^{14} Moleküle) und Colicin M (3×10^{10} Moleküle)
Kurve 4 (□): kein Bruchstück B und Colicin M (2×10^{10} Moleküle)
Kurve 5 (■): kein Bruchstück B und Colicin M (3×10^{10} Moleküle)

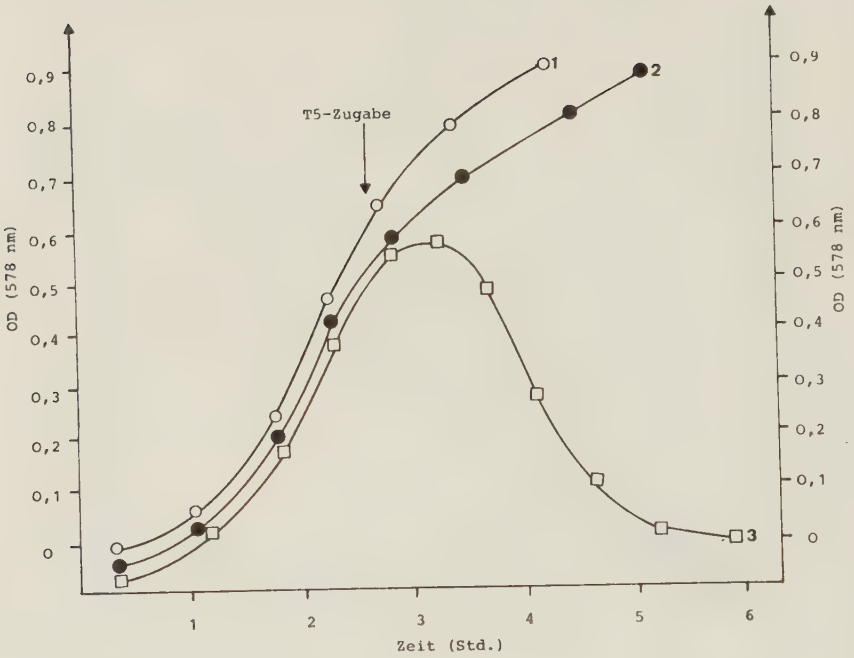


Abb. 19: Wachstumskurven von E. coli K12 AB 2847 bei 37°C im Biophotometer. T5-Phagen wurden jeweils 10 Min. nach Zugabe von Bruchstück B zugegeben.
Kurve 1 ( ): kein Bruchstück B und keine T5-Phagen
Kurve 2 ( ): Bruchstück B (3×10^{14} Moleküle) und T5-Phagen (5×10^{9})
Kurve 3 ( ): kein Bruchstück B und T5-Phagen (5×10^{9})

3.4.2.3 Wirkung von Bruchstück B auf osmotisch geschockte Zellen

Mit diesem Versuch sollte getestet werden, ob Bruchstück B neben der Domäne für die Rezeptorbindung auch noch eine Domäne für die Hemmung der Mureinbiosynthese besitzt.

Die osmotische Schockbehandlung der Zellen folgte der Beschreibung unter Punkt 2.2.12.

Tabelle 9: Wirkung von Bruchstück B und Colicin M auf osmotisch geschockte Zellen. Zu 10^{10} Zellen wurden 10 µg Bruchstück B bzw. Colicin M gegeben und nach Inkubation (15 Min.) sofort mit PBS verdünnt und auf Überlebende ausgestrichen (- ≙ wurde nicht durchgeführt).

	Überlebende Zellen (%)			
	Schock allein	Bruchstück B ohne Schock	Bruchstück B mit Schock	Colicin M mit Schock
P8 fhuA	51	100	0,5	2
Mo 6 tolM	26	100	24	24
C1139	54	-	-	50

Die Werte in Tabelle 9 (Mittelwerte aus 3 Bestimmungen) zeigen eindeutig die Abtötung der geschockten Zellen durch das Bruchstück B. Die Abtötung ist sogar noch höher (in jedem Versuch reproduzierbar höher) als bei Colicin M, was eventuell darauf zurückzuführen ist, daß das Bruchstück B aufgrund seiner geringen Größe besser in die Zellen geschockt werden kann.

Die Kontrolle mit dem Stamm Mo 6 wurde durchgeführt, um sicher zu sein, daß die Abtötung der geschockten Zellen nicht auf irgendwelchen Puffereffekten der Bruchstück B-Lösung beruht, sondern wirklich auf der Hemmung der Mureinbiosynthese. Der Versuch mit dem Stamm C1139 wurde gemacht, um festzustellen, ob der Colicin M-Produzentenstamm, der gegen Colicin M immun ist, auch gegen in die Zelle geschocktes Colicin M immung ist, was der Fall ist.

3.4.2.4 In vitro-Aktivität von Bruchstück B

Die Bruchstück B-Lösung wurde wie unter 2.2.17 beschrieben vorbereitet und von Herrn Dr. J.V. Höltje in einem in vitro-Aktivitätstest untersucht.

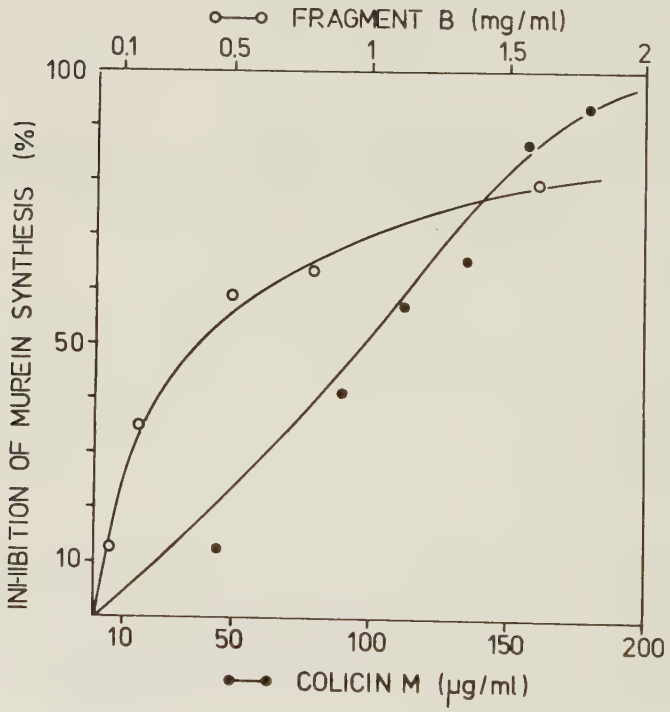


Abb. 20: Hemmung der in vitro-Synthese von Murein durch Bruchstück B. Die in vitro-Mureinsynthese wird in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Bruchstück B durchgeführt. Die Radioaktivität, die am Startpunkt des Papierchromatogramms zurückbleibt, wird als Maß der Mureinbiosynthese genommen.

Die Hemmung der in vitro-Mureinsynthese durch Brückstück B deckt sich mit den Ergebnissen aus den Schockexperimenten unter Punkt 3.4.2.3.

3.5 Antikörper gegen Colicin M

Die Qualität der Colicin M-Antikörper wurde im Ouchterlonytest und mit ELISA getestet.

Im Ouchterlonytest ergaben 10 µl unverdünnte Antikörper mit 10 µl Colicin M-Lösung (1 mg/ml) nach 2 Tagen eine schwache Präzipitationslinie.

Im ELISA-Test konnte man die Antikörper 1:50.000 verdünnen, während die Konzentration der Colicin M-Lösung ungefähr 0,1 µg/ml betrug, um noch gute zeitabhängige Farbreaktion zu erhalten.

Aus den Ergebnissen des ELISA-Tests kann man im Gegensatz zum Ouchterlonytest den Antikörpern eine gute Affinität gegen Colicin M bescheinigen.

3.6 Suche nach Mu(Ap,lac)-Mutanten, die in ihrer Colicin M-Aktivität beeinträchtigt sind

E. coli K12 DR 870 wurde mit dem Phagen Mud2(Ap,lac) mutagenisiert und es wurde nach Mutanten gesucht, die in ihrer Colicin M-Aktivität beeinträchtigt waren. Da der Phage Mud2 fähig ist, Fusionsprodukte zu bilden zwischen dem Genprodukt, in dessen Gen er integriert ist, und der ß-Galaktosidase, war es das Ziel dieses Versuches, Fusionsprodukte zwischen Colicin M und der ß-Galaktosidase zu finden. Anhand dieser Fusionsprodukte hätte man eventuell entscheiden können, inwieweit der COOH-Terminus an der Colicin M-Aktivität beteiligt ist, da je nach Fusionsprodukt der COOH-Terminus von Colicin M mehr oder weniger stark gefehlt hätte.

Solche Fusionsprodukte konnten bei keiner Mutante nachgewiesen werden, sei es, weil sich keine gebildet hatten, sei es, weil sich solche Fusionsprodukte in ihrem isoelektrischen Punkt stark von Colicin M unterscheiden und deshalb durch die benutzte Selektion nicht gefunden werden konnten.

Die nach der Methode 2.2.13.2 und 2.2.13.3 gefundenen Mutanten, die keine Colicin M-Aktivität oder eine stark reduzierte Colicin M-Aktivität besaßen, wurden näher charakterisiert.

3.6.1 Charakterisierung der Mutanten

3.6.1.1 Colicin M- und Colicin B-Aktivität und Immunität

Da die Colicin M- und Colicin B-Aktivität im Überschichtungstest (2.2.13.1) nur sehr ungenau bestimmt werden kann, wurden von allen Mutanten aus 500 ml TY-Kulturen Rohextrakte hergestellt (2.2.9.1.1) und die Aktivitätstests damit durchgeführt (2.2.3).

Die Immunitätstests folgten der Beschreibung unter 2.2.4.

Tabelle 10: Colicin M- und B-Aktivitätstest und Immunitätstest gegen die gleichen Colicine von Mudl und d2(Ap,lac)-Mutanten.

Rohextrakte der Stämme	Colicin M-Titer	Colicin B-Titer	Colicin M-Immunitätstiter	Colicin B-Immunitätstiter
DR 857	10^6	10^4	1 - 10^3	5
DR 858	0	0	10^6	10^4
DR 859	0	0	10^6	10^4
DR 860	50	50	1	1
DR 869	10^6	5 x 10^4	1 - 10^3	5
DR 869 nicht induziert	5 x 10^3	50	wurde nicht bestimmt	
DR 861	10	5	5 x 10^5	5 x 10^3
DR 862	10	1	wurde nicht bestimmt	
DR 863	0	0	5 x 10^3	5 x 10^4
DR 865	50	1	wurde nicht bestimmt	
DR 866	10	10	wurde nicht bestimmt	
DR 855	0	0	10^5	10^4
DR 856	0	0	10^5	10^4
C1139	5 x 10^5	10^4	1	0
C1139 nicht induziert	10^4	5 x 10^3	wurde nicht bestimmt	
DR 872	0	0	10^5	10^4

Die beiden Werte für den Colicin M-Immunitätstiter der Stämme DR 857 und DR 869 von 1 - 10^3 bedeuten, daß sich bei allen 4 Verdünnungsstufen keine klaren, sondern leicht trübe Höfe bildeten, die alle trotz der unterschiedlichen Colicin M-Konzentration gleich aussahen. Diese partielle Immunität lag nicht an einer Mischpopulation, da nach Ausstreichen auf Einzelkolonien der gleiche Effekt auftrat. Eine Anreicherung dieser resistenten Kolonien durch Entnahme von Kolonien aus den trüben Hemmhöfen gelang nicht, da Colicin M-Immunitätstests mit diesen Colicin M-resistenten Kolonien ebenfalls wieder trübe Hemmhöfe bis zu einer Colicin M-Verdünnung von 10^3 ergaben. Ebenfalls fiel bei diesen beiden Stämmen DR 857 und DR 869 eine gewisse Diskrepanz zwischen Colicin M-Aktivität und Colicin M-Immunität auf. Bei fast allen Mutanten besteht eine gute Übereinstimmung zwischen Colicin M- oder Colicin B-Produktion und Immunität gegenüber diesen Colicinen. Je weniger die Stämme produzierten, je empfindlicher sind sie gegen die Colicine. Bei den beiden Stämmen DR 857 und DR 869, die volle Colicin M-Aktivität zeigen, aber eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber Colicin M, könnte der Grund darin liegen, daß sie im nicht induzierten Zustand viel weniger produzieren und damit auch empfindlicher gegen Colicin M werden (beim Immunitätstest wurden die Stämme nicht induziert). Bei DR 869 fällt nämlich auf, daß durch Induktion mit Mitomycin C die Colicin M-Aktivität um den Faktor 500 und die Colicin B-Aktivität um den Faktor 1.000 zunimmt, während beim Wild-Typ C1139 die Aktivitäten jeweils nur um den Faktor 50 bzw. 5 gesteigert werden (steht im Widerspruch zu früheren Untersuchungen über die Mitomycin C-Induktion von Colicin M beim Stamm C1139 (55)).

Von diesen Mu(Ap,lac)-Mutanten produziert einzig die Mutante DR 869 aktive ß-Galaktosidase, die sich aber durch Mitomycin C nicht induzieren läßt.

3.6.1.2 Schnellmethode zur Isolierung von Colicin M und verändertem Colicin M

Aus den Rohextrakten der Mutanten sollte mit einer Schnellmethode (2.2.9.2) Colicin M oder verändertes Colicin M isoliert und gelelek-

trophoretisch untersucht werden.

Abb. 21: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Mu(Ap,lac)-Mutanten, die nach 2.2.9.2 gereinigt wurden (17 % Gel).
Spur 1: Mutante 25, keine Colicin M-Aktivität vorhanden
Spur 2: Mutante 69, ebenfalls keine Colicin M-Aktivität vorhanden
Spur 3: Mutante 75, normale Colicin M-Aktivität
Spur 4: Mutante 165, normale Colicin M-Aktivität (diese 4 Mutanten existieren nicht mehr)
Spur 5: Colicin M

So wie bei den beiden Mutanten 25 und 69, die keine Colicin M-Aktivität zeigten, keine Colicin M-Bande auf dem Gel zu sehen ist (Abb. 21), verhielten sich auch die Mutanten DR 858, DR 859 und DR 863. Ob bei diesen Mutanten kein Colicin M oder ein ladungsmäßig stark verändertes Colicin M gebildet wird, wurde nicht geprüft.

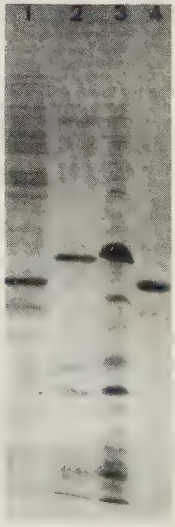


Abb. 22: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Mu(Ap,lac)-Mutanten, die nach 2.2.9.2 gereinigt wurden (17 % Gel).
Spur 1: Mutante DR 869
Spur 2: Mutante DR 855
Spur 3: Mutante DR 856
Spur 4: Colicin M

Bei der Untersuchung der Mutanten fielen vor allem die beiden Mutanten DR 855 und DR 856 auf, die ein größeres Colicin M produzierten (Abb. 22) und zunächst völlig inaktiv waren.

3.6.1.3 Konjugation des mutierten ColM, B-Plasmids

Um sicher zu sein, daß bei den Mutanten DR 858, DR 859, DR 863, DR 855 und DR 856, die alle keine Colicin M- und B-Aktivität besitzen und gegen diese beiden Colicine voll empfindlich sind, der Phage Mu(Ap,lac) noch auf dem Plasmid integriert ist, wurde durch Kreuzung dieser Mutanten mit dem Stamm ZI 397 geprüft, ob die Ampicillinresistenz konjugierbar ist.

Die Konjugation wurde wie unter 2.2.13.1 beschrieben durchgeführt. Selektioniert wurde auf Ampicillin (25 µg/ml) und Spectinomycin (100 µg/ml). Bei allen Kreuzungen war die Ampicillinresistenz, d.h. der Phage Mu(Ap,lac) mit dem Plasmid, konjugierbar.

Von dem Stamm DR 872 (Kreuzungsprodukt aus DR 856/ZI 397) wurde auch kontrolliert, ob die größere Colicin M-Bande konjugierbar ist, was der Fall war. Dies zeigt deutlich, daß dieses Protein plasmidcodiert ist.

3.7 Nachweis und Charakterisierung von Pro-Colicin M

Der Verdacht lag nahe, daß es sich bei diesem Protein, das etwas größer ist als Colicin M, um eine Proform von Colicin M handelt. Um dies eindeutig nachzuweisen, wurde zum einen versucht, dieses Colicin M-inaktive Protein zu aktivieren, zum anderen, den NH_2-Terminus so weit zu sequenzieren, um ab einem bestimmten Punkt eine Übereinstimmung mit dem schon bekannten NH_2-Terminus von Colicin M zu erzielen.

3.7.1 Isolierung von Pro-Colicin M

Um die Aktivierungsversuche und vor allem auch die Sequenzierung des NH_2-Terminus durchzuführen, mußten zunächst größere Mengen Pro-Colicin M isoliert werden. Ob die Isolierung genau so gemacht werden konnte wie bei Colicin M, wurde in einem Vorversuch getestet.

3 x 2 l TY-Medium wurde mit der Mutante DR 856 angeimpft und daraus ein Rohextrakt hergestellt (2.2.9.1.1). Dieser Rohextrakt wurde auf eine CMC52-Säule (V = 25 ml) gepumpt, mit 150 ml Colicin M-Puffer gespült und ein 500 ml NaCl-Gradient von 0 bis 0,3 M angelegt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 4 ml/Std. Da die Fraktionen nicht mit Aktivitätstests geprüft werden konnten, wurden sie gelelektrophoretisch untersucht.

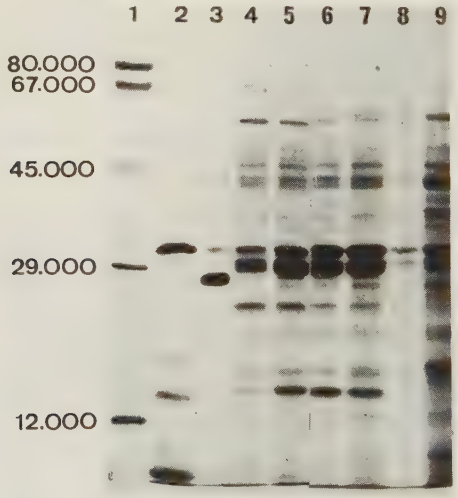


Abb. 23: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von einer Pro-Colicin M-Reinigung (Mutante DR 856) mittels CMC52-Säule (17 % Gel).
Spur 1: Markerproteine (Cytochrom C 12.000, Carboanhydrase 29.000, Ovalbumin 45.000, RSA 67.000, Human-Transferrin 80.000)
Spur 2: Mutante 855, nach 2.2.9.2 gereinigter Rohextrakt
Spur 3: Colicin M
Spur 4 bis 9: Fraktion 75 bis 70 aus der CMC52-Säule

Aus diesem Versuch zur Isolierung von Pro-Colicin M konnte man die Erkenntnis ziehen, daß Pro-Colicin M zwar an den Kationenaustauscher CMC52 bindet, aber mit dem NaCl-Gradienten viel früher als Colicin M eluiert wird, also nicht so basisch ist wie Colicin M. Auch sieht man auf dem Gel (Abb. 23) direkt unterhalb der Pro-Colicin M-Bande eine noch stärkere Bande, die aber noch größer ist als die Bande von Colicin M. Es deutet darauf hin, daß diese untere Bande ein Abbauprodukt von Pro-Colicin M ist, da nämlich aus diesen zwei Banden sich eine Bande bildete, nachdem die Fraktionen 72, 73 und 74 vereint und mittels Polyäthylenglykol eingeengt worden waren.

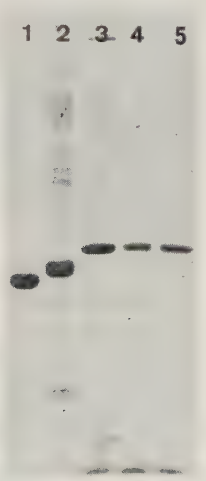
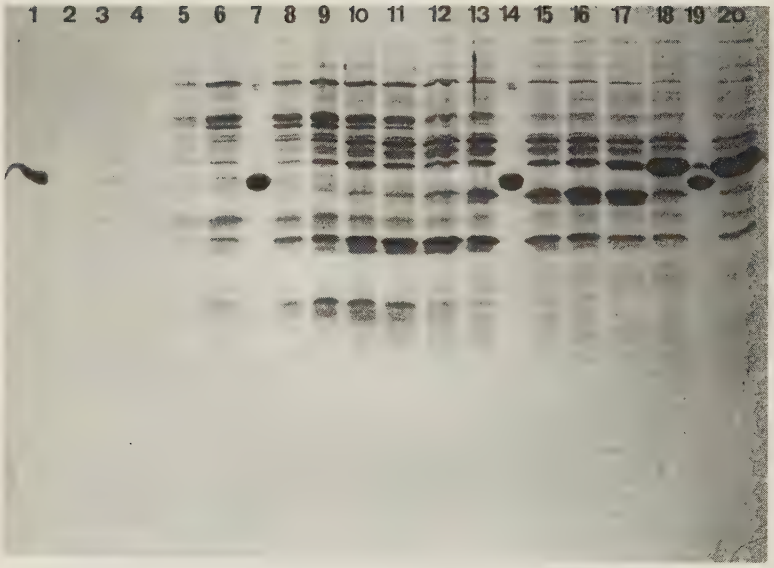


Abb. 24: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von gereinigtem Pro-Colicin M (17 % Gel).
Spur 1: Colicin M
Spur 2: mittels CMC52-Säule gereinigtes Pro-Colicin M der konzentrierten Fraktionen 72, 73, 74
Spur 3 und 4: Mutante 855, nach 2.2.9.2 gereinigte Rohextrakte aus unterschiedlichen Aufarbeitungen
Spur 5: Mutante 856, nach 2.2.9.2 gereinigter Rohextrakt

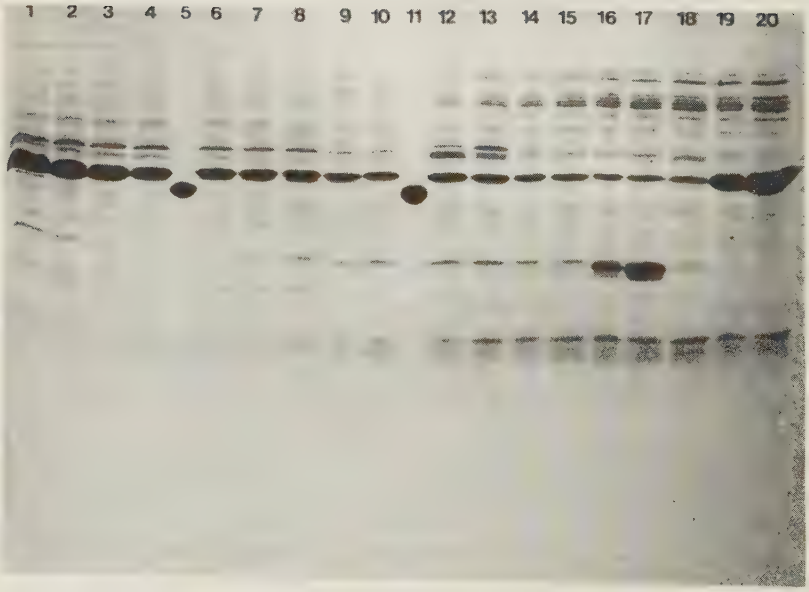
Die Tatsache, daß sich die Größe von Pro-Colicin M von alleine auf dem Gel sichtbar verkleinert, konnte, abgesehen von diesem einen Fall beim Vorversuch zur Isolierung von Pro-Colicin M, nicht mehr beobachtet werden.

Pro-Colicin M wurde aus dem Stamm DR 855 wie unter 2.2.9.2 beschrieben isoliert.

Der Rohextrakt aus 200 g Zellen wurde auf die CMC52-Säule gepumpt, gewaschen und mit einem 10 l NaCl-Gradienten von 0 bis 0,3 M eluiert. Die gesammelten Fraktionen (10 ml/Std.) wurden gelelektrophoretisch untersucht.


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

II


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

In den Fraktionen 96 bis 108 kann man auf dem Gel (Abb. 25) eine starke Pro-Colicin M-Bande erkennen. Sehr überraschend war, daß in den Fraktionen 166 bis 176 diese Bande gleicher Größe noch einmal erscheint. Diese beiden Proteine unterscheiden sich lediglich in ihrer Ladung, was durch das Fehlen von ein oder zwei Aminosäuren schon bewirkt werden könnte. Leitfähigkeitsmessungen der Fraktionen ergaben, daß der erste Pro-Colicin M-Peak (Fraktionen 96 bis 108) bei einer Salzkonzentration von ungefähr 30 mM, der zweite Pro-Colicin M-Peak (Fraktionen 166 - 176) bei ungefähr 50 mM eluiert wird.

Was sich bei dem Vorversuch der Pro-Colicin M-Isolierung schon andeutete, bestätigte sich voll, nämlich, daß Pro-Colicin M durch die frühere Eluierung durch den NaCl-Gradienten mit einem Säulenlauf nicht so sauber zu isolieren ist wie Colicin M.

Da vor allem für die Sequenzierung des NH_2-Terminus eine sehr saubere Präparation benötigt wurde, wurde mit einem zweiten Säulenlauf versucht, die anderen Proteine abzutrennen. Als Säulenmaterial wurde CM50-Sephadex gewählt, ebenfalls ein Kationenaustauscher mit einer anderen Matrix als CMC52. Für diese zweite Reinigungsstufe wurden die beiden Fraktionen 100 und 101 aus der ersten Reinigung (CMC52-Säule) verwendet. Die Durchführung folgte der Beschreibung unter 2.2.9.1.4. Die Fraktionen wurden gelelektrophoretisch untersucht.

Abb. 25: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von den Fraktionen der Pro-Colicin M-Isolierung aus der CMC52-Säule (17 % Gel).
Gel I: Spuren 1, 7, 14 und 19: Colicin M
Spuren 2 bis 6: Fraktionen 30, 35, 40, 45 und 50
Spuren 8 bis 13: Fraktionen 55, 60, 65, 70, 75 und 80
Spuren 15 bis 18: Fraktionen 84, 88, 92 und 96
Spur 20: Fraktion 98
Gel II: Spuren 5 und 11: Colicin M
Spuren 1 bis 4: Fraktionen 102, 106, 110 und 114
Spuren 6 bis 10: Fraktionen 118, 122, 126, 130 und 134
Spuren 12 bis 20: Fraktionen 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166 und 170.

Abb. 26: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von den Fraktionen der Pro-Colicin M-Isolierung aus der CM50-Sephadex-Säule (17 % Gel).
Spuren 1 bis 4: Fraktionen 7, 8, 9 und 10
Spur 5: Colicin M
Spur 6: Pro-Colicin M (Fraktion 103 aus der CMC52-Säule)
Spur 7 bis 9: Fraktionen 11, 12 und 13
Spur 10: Colicin M
Spur 11 bis 15: Fraktionen 37, 38, 39, 40 und 41.

Pro-Colicin M konnte mit diesem zweiten Säulenlauf (CM50-Sephadex) sehr sauber gereinigt werden (Abb. 26 Spur 12 und 13), da der Hauptteil der Verunreinigung im Gegensatz zu Pro-Colicin M durch die Säule lief ohne daran zu binden. Diese zweite Reinigung von Pro-Colicin M gelang jedoch nur mit den ersten Pro-Colicin M-Fraktionen. Das basischere Pro-Colicin M (Fraktionen 166 - 176) konnte wegen seiner anderen Ladungsverhältnisse nicht von seinen Verunreinigungen abgetrennt werden.

3.7.2 Chemische Charakterisierung von Pro-Colicin M

3.7.2.1 Molekulargewichtsbestimmung

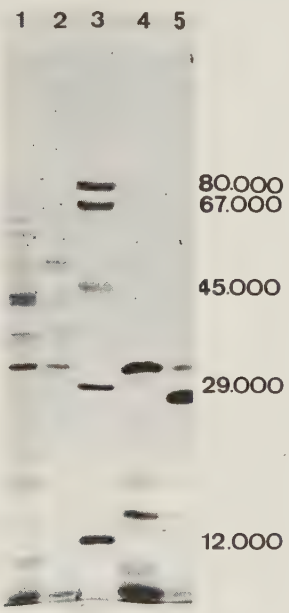


Abb. 27: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung von Pro-Colicin M (17 % Gel).
Spur 1 und 2: Pro-Colicin M aus Mutante DR 856, gereinigt nach 2.2.9.2 (zwei zeitlich verschiedene Reinigungen)
Spur 3: Markerproteine (Cytochrom C 12.000, Carboanhydrase 29.000, Ovalbumin 45.000, RSA 67.000, Human-Transferrin 80.000)
Spur 4: Pro-Colicin M aus Mutante DR 855, gereinigt nach 2.2.9.2
Spur 5: Colicin M

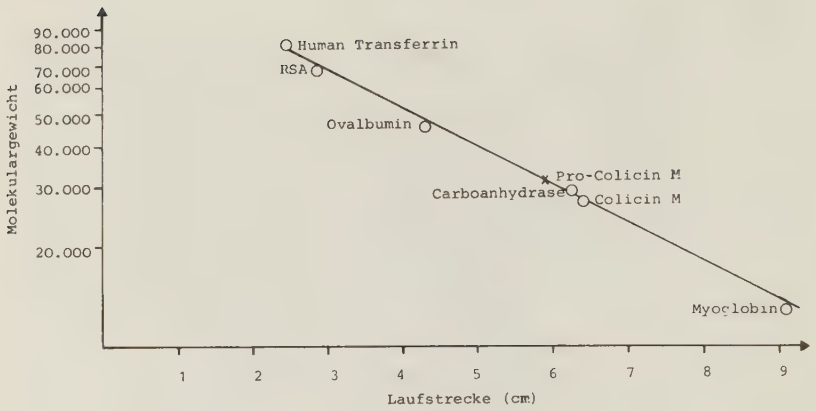


Abb. 28: Bestimmung des Molekulargewichts von Pro-Colicin M (s. auch Abb. 27).

Das Molekulargewicht von Pro-Colicin M wurde aufgrund von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit 31.000 Dalton ± 1.000 bestimmt. Damit wäre Pro-Colicin M um etwa 4.000 Dalton größer als Colicin M, was ungefähr einer Anzahl von 30 Aminosäuren entspricht.

3.7.2.2 Sequenzierung des NH_2-Terminus

Um zu beweisen, daß dieses 31.000 Dalton-Protein eine Proform von Colicin M darstellt,müßte der NH_2-Terminus sehr weit sequenziert werden und zwar mindestens 35 Aminosäuren weit, um eine Übereinstimmung mit den ersten Aminosäuren des NH_2-Terminus von Colicin M zu erreichen.

Der NH_2-Terminus wurde wie schon beim Colicin M von Frau B. Wittmann-Liebold mit 0,5 mg Protein bestimmt. Die Probe wurde wie unter 2.2.18 beschrieben vorbereitet.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Met-	Asp-		-Ser-	Thr-	Ser-	Ala-	Ala-		-Ser-	Ser-	Asn-	Tyr-	Thr-	Asn-	-
												Thr			

17	18	19
Ser-		-Ala-
Ile		Lys

Ab dem 20. Edman-Abbau waren die Ausbeuten an PTH-Aminosäuren zu gering, um eine Sequenz anzugeben. Die Anzahl der sequenzierten Aminosäuren reichte nicht aus, um zu zeigen, daß das 31.000 Dalton-Protein eine Proform von Colicin M darstellt.

3.7.2.3 Bestimmung des COOH-Terminus

Die Bestimmung wurde mit Carboxypeptidase B wie unter 2.2.6 beschrieben durchgeführt, um zu überprüfen, ob der COOH-Terminus von Pro-Colicin M mit dem von Colicin M identisch ist.

10 ml Pro-Colicin M-Lösung (Fraktion 103 aus 1. Reinigung mit CMC52-Säule), in der sich etwa 50 nM Pro-Colicin M befanden, wurden nach der Dialyse gegen 0,05 M N-Äthylmorpholinacetat pH 8,5 und 0,1 M NaCl mit Carboxypeptidase B (Enzym/Substrat Verhältnis 1:50) 20 Std. bei 37°C direkt im Dialyseschlauch inkubiert. Um die Dialyse zu kontrollieren, wurden noch je 25 nM Norleucin zugesetzt. Dialysiert wurde gegen 15 ml deion. Wasser, das nach 20 Std. eingedampft und in Natriumcitratpuffer aufgenommen wurde. Die anschließende Aminosäureanalyse ergab folgendes Ergebnis:

Tabelle 11: Bestimmung des COOH-Terminus von Pro-Colicin M. Vergleich der Aminosäureanalysen von Kontrolle und Carboxypeptidase B-Spaltung (Aminosäuren sind ausgedrückt in nM).

	Kontrolle (statt Pro-Colicin M-Lösung deion. Wasser)	Carboxypeptidase B-Spaltung von 50 nM Pro-Colicin M
Asp	1,4	1,1
Thr	1,5	1,2
Ser	4,1	3,2
Glu	0,5	0,5
Gly	60	16
Val	0,8	0,8
Ile	0,8	0,7
Leu	1,2	1,5
Norleu	17	15
Lys	1,2	7,1
Hist	0,4	0,3
Arg	0,4	6,0

Vergleicht man die Aminosäurewerte aus Tabelle 11 von Kontrolle und Spaltung miteinander, so sieht man, daß fast alle Werte mehr oder weniger gleich groß sind. Höhere Aminosäurekonzentrationen bei der Spaltung von Pro-Colicin M ergab es nur bei Arginin und Lysin. Warum der Glycin-Wert vor allem bei der Kontrolle, aber auch bei der Spaltung so hoch liegt, ist schwer zu sagen. Glycin ist meistens ein Zeichen von Verunreinigungen. Allerdings müßten dann auch andere Aminosäuren etwas höher liegen.

Die Erhöhung des Arginin- und Lysinwertes beträgt jeweils ungefähr 6 nM. Da die Dialyse nur zu etwa 64 % abgelaufen ist (Norleucinwert), kann man davon ausgehen, daß zwischen 9 und 10 nM Arginin bzw. Lysin abgespalten worden sind. Bei einem Einsatz von 50 nM Pro-Colicin M würde die Spaltungsrate nur maximal 20 % betragen. Da man bei diesem Versuch sehr viel Spaltmaterial benötigt, konnte er wegen der nur sehr geringen zur Verfügungen stehenden Pro-Colicin M-Mengen kein zweites Mal ausgeführt werden. Aus diesem Grund und wegen der nur sehr kleinen Spaltungsrate von 20 % kann nicht mit Sicherheit gesagt wer-

den, daß der COOH-Terminus von Colicin M und Pro-Colicin M identisch ist.

Es fiel bei diesem Versuch auch auf, daß Pro-Colicin M durch die Spaltung mit Carboxypeptidase nicht wie Colicin M oder Bruchstück B ausfiel, sondern in Lösung blieb.

3.7.3 Aktivierung von Pro-Colicin M

3.7.3.1 Autoaktivierung

Diese Autoaktivierung von Colicin M und in wenigen Fällen auch von Colicin B in Rohextrakten der beiden Stämme DR 856 und DR 872 verlief äußerst unregelmäßig. Zum Teil trat die Colicin M-Aktivität (fhuA-spezifische Aktivität) nach einem Tag schon auf, zum Teil erst nach einer Woche und manchmal fand überhaupt keine Aktivierung statt. Eine Selbstaktivierung von Colicin B (fepA-spezifische Aktivität) konnte insgesamt nur zweimal nachgewiesen werden (wobei diese nicht so oft wie eine Colicin M-Aktivität nachgeprüft wurde). So unregelmäßig der Zeitpunkt der Aktivierung war, so unterschiedlich war auch der sich bildende Colicin M-Titer, der sich im allgemeinen zwischen 1 und 10 bewegte, aber in einem Fall bis 10^2 anstieg. Eine Selbstaktivierung in gereinigten Rohextrakten konnte nie beobachtet werden.

3.7.3.2 Andere Aktivierungsmethoden von Pro-Colicin M

Die Aktivierungsversuche von Pro-Colicin M mit Proteasen, mit anderen Rohextrakten, durch Kreuzung, mit Rattenleber-Mitochondrien und mit einer Signalpeptidase (beschrieben unter 2.2.14.2 bis 2.2.14.6) führten alle zu keinem positiven Ergebnis. Eine Aktivierung konnte in keinem Fall erreicht werden.

3.7.4 Bestimmung der Rezeptor-Bindeaktivität

Die Durchführung folgte der Beschreibung unter 2.2.11.2.

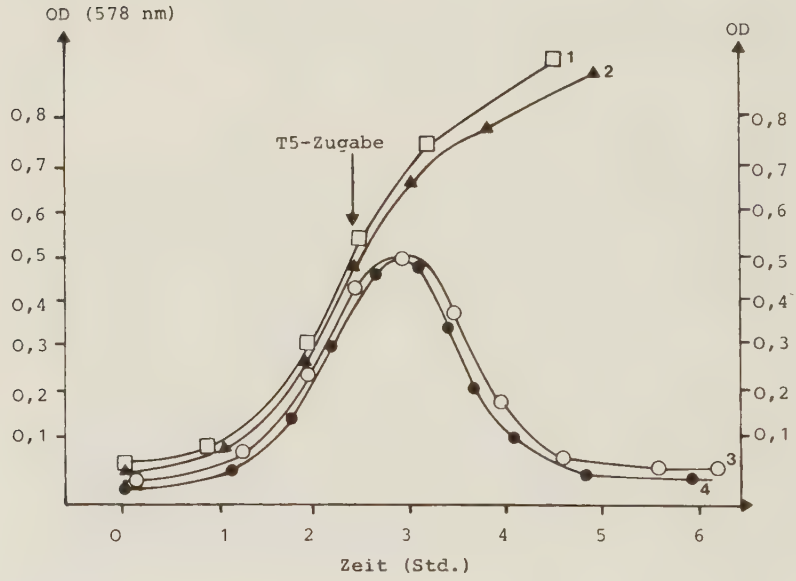


Abb. 29: Wachstumskurven von E. coli K12 AB 2847 bei 37°C im Biophotometer. T5-Phagen wurden jeweils 10 Min. nach Zugabe von Pro-Colicin M zugegeben.
Kurve 1 (□): kein Pro-Colicin M und keine T5-Phagen
Kurve 2 (▲): 3×10^{14} Moleküle Pro-Colicin M, keine T5-Phagen
Kurve 3 (○): 3×10^{14} Moleküle Pro-Colicin M, 5×10^{9} T5-Phagen
Kurve 4 (●): 6×10^{14} Moleküle Pro-Colicin M, 5×10^{9} T5-Phagen.

Aus den Kurven in Abb. 29 ist ersichtlich, daß Pro-Colicin M Zellen vor T5-Infektionen nicht schützen kann. Dies bedeutet, daß Pro-Colicin M nicht oder nur sehr schlecht an den Colicin M-Rezeptor fhuA binden kann.

3.7.5 Wirkung von Pro-Colicin M auf osmotisch geschockte Zellen

Mit diesem Versuch sollte getestet werden, ob das inaktive Pro-Colicin M, wenn es durch osmotischen Schock in Zellen hineinkommt, volle Aktivität entfalten kann, d.h. die Mureinbiosynthese hemmen kann. Die osmotische Schockbehandlung folgt der Beschreibung unter Punkt 2.2.12.

Dieser Versuch wurde oft wiederholt, da die Ergebnisse sehr unterschiedlich waren. Vor allem fiel auf, daß Verdünnungsreihen bei Proben mit Pro-Colicin M sehr unregelmäßig ausfielen. so kam es häufig vor, daß die Zahl der Überlebenden in der Verdünnungsstufe 10^4 genau so hoch war wie in der Verdünnungsstufe 10^5. Da dieser Effekt häufig und ausschließlich bei Proben mit Pro-Colicin M vorkam, muß davon ausgegangen werden, daß dies ein Pro-Colicin-spezifischer Effekt ist.

Tabelle 12: Wirkung von Pro-Colicin M und Colicin M auf osmotisch geschockte Zellen. Zu 10^{10} Zellen wurden 10 µg Pro-Colicin M bzw. Colicin M gegeben und nach Inkubation (15 Min.) sofort mit PBS verdünnt und auf Überlebende ausgestrichen. Ist nur ein Wert angegeben, handelt es sich um den Mittelwert aus zwei oder mehr Bestimmungen.

	Überlebende Zellen (%)			
	Schock allein	Pro-Colicin M ohne Schock	Pro-Colicin M mit Schock	Colicin M mit Schock
P8 fhuA	51	100, 75, 100, 41	3,2, 1,4-5,5, 5,4-11,8, 0,3-4,5, 40	2
Mo6 tolM	26	-/-	26	24

Die Werte in Tabelle 12 zeigen, daß Pro-Colicin M auf jeden Fall eine Wirkung auf osmotisch geschockte Zellen hat und zwar eine Colicin M-spezifische Wirkung, da geschockte Zellen vom Stamm Mo6 tolM gegen Pro-Colicin M unempfindlich sind. Was es mit diesen seltsamen Effekten bei den Verdünnungsreihen auf sich hat, konnte nicht geklärt werden.

3.7.6 In vitro-Aktivität von Pro-Colicin M

Eine Pro-Colicin M-Lösung wurde wie unter 2.2.17 beschrieben vorbereitet und von Herrn Dr. J.V. Höltje in einem in vitro Colicin M-Aktivitätstest untersucht. Da die Colicin M- bzw. Pro-Colicin M-Konzentrationen in diesem Test sehr hoch sein müssen (1 bis 2 mg/ml), ergab die Vorbereitung der Probe Schwierigkeiten, da sauberes Pro-Colicin M nur in sehr geringen Mengen und sehr verdünnt zur Verfügung stand. Aus diesem Grund wurde der in vitro-Test mit Pro-Colicin M nur zweimal ausgeführt und keine in vitro-Aktivität gefunden, wobei in dieser Zeit der Test wegen schlechter Membrane nicht sehr gut funktionierte.

Da die benutzten Pro-Colicin M-Lösungen nie völlig sauber waren, sich also immer noch Fremdprotein in den Lösungen befand, konnte die Pro-Colicin M-Konzentration nach Fluram-Test (2.2.2) nur abgeschätzt werden. Eventuell waren die Konzentrationen für den in vitro-Test zu gering.

3.7.7 Immunchemische Kreuzreaktion von Pro-Colicin M und Colicin M mit ELISA und Ouchterlonytest

Pro-Colicin M ergab mit Colicin M-Antikörper im unter Punkt 2.2.16.4 beschriebenen Ouchterlonytest keine Präzipitationslinie.

Tabelle 13: ELISA (2.2.15.2) von gereinigtem Colicin M und Pro-Colicin M, sowie von Rohextrakten der Stämme DR 856 (Pro-Colicin M-Produzent), DR 869 (Colicin M-Produzent), DR 863 (Mutante, die kein Colicin M mehr produziert) und DR 871 (Ausgangsstamm, kein Colicin M-Plasmid) mit Colicin M-Antikörper. Die Antikörper wurden 1:50.000 verdünnt. Die Extinktionswerte stellen Mittelwerte zweier Bestimmungen dar.

	Extinktion bei 405 nm
Colicin M (1 µg/ml)	0,62
Pro-Colicin M (1 µg/ml)	0,36
Blindwert	0,20
Rohextrakte, gereinigt nach 2.2.9.2 von	
DR 856	0,42
DR 869	0,47
DR 863	0,13
DR 871	0,19

Gereinigtes Pro-Colicin M reagiert schwächer gegenüber den Antikörpern als Colicin M. Vergleicht man jedoch die Reaktion der gereinigten Rohextrakte gegenüber den Antikörpern, so sieht man, daß die Mutante DR 856, die Pro-Colicin M produziert, fast eine so starke Reaktion zeigt wie Mutante DR 869, die Colicin M produziert. Einen starken Abfall gibt es bei der Mutante DR 863, die kein Colicin M produziert und bei DR 871, die das ColM-Plasmid nicht besitzt.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man auf jeden Fall von einer gewissen Kreuzreaktion zwischen den Colicin M-Antikörpern und Colicin M und Pro-Colicin M sprechen. Die Affinität der Antikörper gegenüber Pro-Colicin M ist anscheinend nicht so gut wie zu Colicin M, da im Ouchterlonytest keine Präzipitation aufgetreten war. Es konnte auch festgestellt werden, daß Pro-Colicin M aus Rohextrakten im Gegensatz zu Colicin M mit Antikörpern nicht fällbar ist, was gelelektrophoretisch nachgeprüft wurde.

3.8 Versuch des Nachweises von Pro-Colicin B

3.8.1 Schnellreinigung von Colicin B

Nach der These, daß der Phage Mu bei der Mutante DR 855 und DR 856 in ein Gen inseriert ist, das für ein Genprodukt kodiert, das in irgendeiner Form das Zurechtschneiden von Pro-Colicin M zu Colicin M bewirkt, sollten die beiden Mutanten auch eine Proform von Colicin B besitzen. Um Pro-Colicin B nachzuweisen, mußte zunächst Colicin B isoliert und seine Größe genau bestimmt werden, um diese dann mit eventuell vorhandenem Pro-Colicin B zu vergleichen. Isoliert wurde Colicin B aus dem Wild Typ E. coli C1139 nach der Methode 2.2.9.8. Der Rohextrakt besaß einen Colicin B-Titer von 10^4. die mit 150 mM Natriumphosphat von der DE 52 Cellulose eluierte Colicin B-Lösung hatte ebenfalls noch einen Colicin B-Titer von 10^4.

Eine Pro-Colicin B-Reinigung nach dem gleichen Muster aus der Mutante DR 855 brachte keinen Erfolg. Entweder existiert eine Proform von Colicin B nicht, oder aber sie verhält sich nicht so wie Colicin B und konnte deshalb nicht nach dem gleichen Reinigungsmuster wie Colicin B isoliert werden.

Auf dem Gel Abb. 30 sieht man, daß Colicin B für die zwei verwendeten Reinigungsschritte schon sehr sauber ist (Spur 1, 3 und 6). Allerdings bildet Colicin B auf Spur 1 zwei Banden, obwohl die Probe nicht mit Merkaptoäthanol gekocht, also nicht reduziert wurde. Reduziert man die Probe, so verschwindet die kleinere Bande, die größere Bande bleibt unverändert (Spur 3). Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen von Reeves (52), der bei Polyacrylamid-Gelelektrophoresen mit SDS und Merkaptoäthanol beide Banden findet mit den Molekulargewichten 58.000 und 34.500 Dalton, während er das Molekulargewicht mit einer Sephadex G-200-Säule mit 92.000 Dalton bestimmt.

Abb. 30: SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese von Colicin B mit und ohne Reduktion (11 % Gel).
Spur 1: Gereinigtes Colicin B aus E. coli C1139 ohne Reduktion
Spur 2: Colicin B-Reinigung aus DR 855 (eventuell Pro-Colicin B) ohne Reduktion
Spur 3: Spur 1 mit Reduktion (20 µl)
Spur 4: Spur 2 mit Reduktion (20 µl)
Spur 5: Proteine der äußeren Membran (Markerproteine für Molekulargewichtsbestimmung)
Spur 6: Spur 1 mit Reduktion (10 µl)
Spur 7: Spur 2 mit Reduktion (10 µl)
Spur 8: Rohextrakt DR 855 Fällung mit CB-Antikörper, mit Reduktion
Spur 9: Rohextrakt C1139 Fällung mit CB-Antikörper, mit Reduktion
Spur 10: Markerproteine: Carboanhydrase (29.000), RSA (67.000), Human-Transferrin (80.000)
Spur 11: Colicin B-Reinigung aus C1139, Fällung mit Antikörper, mit Reduktion
Spur 12: Colicin B-Reinigung aus DR 855, Fällung mit Antikörper, mit Reduktion.

In den Spuren 2, 4 und 7 sieht man keine Colicin B-Bande bzw. eine etwas größere Colicin B-Bande (Pro-Colicin B). Wie oben schon erwähnt existiert entweder Pro-Colicin B nicht, oder es ist bei der Reinigung verloren gegangen.

Die Spuren (8, 9, 11 und 12), in denen mit Colicin B-Antikörpern gefällte Rohextrakte oder Reinigungen aufgetragen wurden, sind sehr schwer auszuwerten, da genau in dem Bereich um 60.000 Dalton die Antikörper (die schweren Ketten der Immunglobuline, vor allem die α-, ε- und δ-Kette) starke Banden im Gel ergaben.

3.8.2 Molekulargewichtsbestimmung von Colicin B

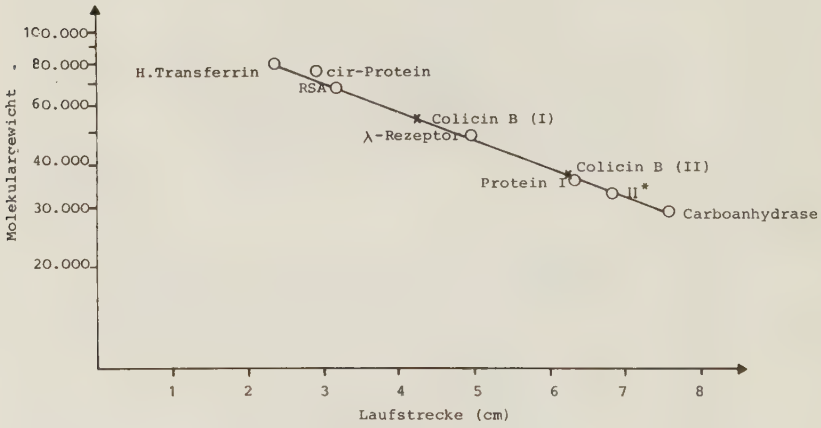


Abb. 31: Bestimmung des Molekulargewichts von Colicin B (s. Abb. 30).

Die Molekulargewichtsbestimmung ergab für die zwei Colicin B-Banden ein Molekulargewicht von 55.000 und 37.000 Dalton.

3.8.3 ELISA mit Colicin B und "Pro-Colicin B"

Nachdem aus dem Rohextrakt der Mutante DR 855 Pro-Colicin B nicht isoliert und nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, mit ELISA die Existenz einer Proform von Colicin B nachzuweisen.

Tabelle 14: ELISA (2.2.15.2) mit Rohextrakten der Stämme C1139 (Colicin B-Produzent), DR 855 (eventuell Pro-Colicin B-Produzent) und DR 859 (Mutante, die kein Colicin B produziert). Die Antikörper wurden 1:1.000 verdünnt, die Rohextrakte 1:100. Der Versuch wurde nur einmal durchgeführt.

	Extinktion bei 405 nm
Rohextrakt C1139	0,58
Rohextrakt DR 855	0,47
Rohextrakt DR 859	0,37
Blindwert	0,22

Der Rohextrakt der Mutante DR 855 reagiert mit den Colicin B-Antikörpern schwächer als der Rohextrakt des Wild Typs, aber deutlich stärker als die Mutante DR 859, die kein Colicin B produziert (zumindest wurde bei dieser Mutante bisher in keinem Fall Colicin B-Aktivität nachgewiesen).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Mutante DR 855 und damit wahrscheinlich auch die Mutante DR 856 ein Pro-Colicin B produzieren.

3.8.4 ELISA an einem geblotteten Gel

Colicin B-Reinigungen der Stämme C1139 und DR 855 sowie mit Colicin B-Antikörpern gefällte Rohextrakte dieser beiden Stämme wurden wie unter Punkt 2.2.16.3 beschrieben mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Folie geblottet. Nach dem Blotten wurde ein Teil der Spuren mit Amidoschwarz angefärbt, der Rest mit Colicin B-Antikörper und Peroxidase,gekoppelt an Protein A, inkubiert.

Abb. 32: Geblottetes SDS-Polyacrylamid-Gel (11 %). Spuren 1-7 wurden mittels ELISA untersucht, während die Spuren 8-9 mit Amidoschwarz angefärbt wurden.
Spur 1: Gereinigtes Colicin B von C1139 ohne Reduktion
Spur 2: Colicin B-Reinigung von DR 855 mit Reduktion
Spur 3: Gereinigtes Colicin B von C1139 mit Reduktion
Spur 4: Rohextrakt C1139, gefällt mit CB-Antikörper 20 µl mit Reduktion
Spur 5: Rohextrakt DR 855, gefällt mit CB-Antikörper 20 µl mit Reduktion
Spur 6: s. Spur 4 10 µl
Spur 7: s. Spur 5 10 µl
Spur 8: s. Spur 4 10 µl mit Amidoschwarz angefärbt
Spur 9: s. Spur 5 10 µl mit Amidoschwarz angefärbt

Die große Bande von Colicin B (56.000 Dalton) wurde bei dem ELISA sehr gut angefärbt (Spuren 1, 3, 4 und 6), während die kleinere Bande (37.000 Dalton) in Spur 1 nicht sichtbar ist, obwohl die Probe nicht mit Merkaptoäthanol vorher gekocht worden war. Dies bedeutet, daß die Colicin B-Antikörper nur gegen das größere Protein gerichtet sind.

Da in der mit Amidoschwarz angefärbten Spur 9 keine Proteinbanden sichtbar sind, ist klar, daß auch in den Spuren 5 und 7 nichts zu sehen ist. Es wurde zu wenig aufgetragen.

In Spur 2 (CB-Reinigung von DR 855) sieht man eine leichte Colicin B-Bande. Es könnte aber gut sein, daß beim Auftragen der Proben in das Polyacrylamid-Gel Spur 2 mit kleinen Mengen aus Spur 1 und 3 verunreinigt wurde. Falls es sich aber tatsächlich um die Colicin B-Bande handelt, würde dies bedeuten, daß beim Pro-Colicin B das 37.000 Dalton große Protein verlängert wäre, da die große Colicin B-Bande die gleiche Größe wie in Spur 1 und 3 besitzt.

4. Diskussion

4.1 Domänen bei Colicin M

Zunächst wurde versucht, Colicin M mit verschiedenen Proteasen wie Aminopeptidase M, Chymotrypsin A_4, Trypsin und Proteinase K so zu spalten, daß keine intakten Colicin M-Moleküle mehr vorhanden waren, aber trotzdem noch Colicin M-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Damit hätte man kleinere noch aktive Colicin M-Bruchstücke nachweisen können.

Mit Trypsin gelang dies nicht, da Colicin M in seiner nativen Form von Trypsin nur sehr schlecht gespalten wird. Die Moleküle, die gespalten werden, werden dann sofort vollständig zu kleinen Peptiden abgebaut, da man auf SDS-Polyacrylamid-Gelen von Colicin M-Spaltungen mit Trypsin keine Bruchstücke sehen konnte, sondern nur nach längerer Inkubationszeit ein Abnehmen der Colicin M-Bande.

Spaltungen mit Chymotrypsin A_4 ergaben zwar kleinere Bruchstücke, aber es entstanden so viele Bruchstücke, daß eine Trennung unmöglich erschien.

Erfolgversprechend verliefen die Spaltungen mit Aminopeptidase M und Proteinase K.

Zwar gelang es nicht, Colicin M mit Aminopeptidase M vollständig zu spalten (Colicin M-Bande war bei jeder APM-Spaltung auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel noch zu sehen), aber eine Trennung von ungespaltenem Colicin M und einem Bruchstück, das sich während der Spaltung anreicherte, konnte mittels HPLC auf einer TSK-Säule durchgeführt werden. Dieses Bruchstück besaß eindeutig noch Colicin M-Aktivität, wobei die Aktivität in Relation zur Proteinkonzentration um den Faktor 50 bis 100 verglichen mit intaktem Colicin M vermindert war. Das Molekulargewicht dieses angereicherten Bruchstückes wurde auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel mit ungefähr 14.000 Dalton bestimmt, während sich auf der TSK-Säule eine Molekulargewicht von 8.000 bis 10.000 ergab. Worauf diese Diskrepanz im Molekulargewicht beruht, kann nicht

entschieden werden. Eventuell verlief die APM-Spaltung, die auf der TSK-Säule aufgetrennt wurde, etwas stärker, d.h. Colicin M wurde vom NH_2-terminalen Ende her weiter abgebaut.

Aus diesem Versuch muß man schließen, daß dem APM-Bruchstück, das nur noch etwa halb so groß ist wie Colicin M, und das vom NH_2-Terminus her abgebaut ist, eine funktionale Domäne fehlt, die die Colicin M-Aktivität beeinträchtigt, aber nicht zerstört. Es kann sich hierbei nur um die Domäne für die Rezeptorbindung oder Translokation handeln. Eine intensivere Untersuchung dieses Bruchstückes konnte nicht durchgeführt werden, da die Aktivität dieses Bruchstückes kurz nach der Trennung auf der TSK-Säule durch das im Elutionspuffer befindliche SDS zerstört wurde.

Eine Proteinase K-Spaltung bei pH 8,0 brachte zunächst ebenfalls positive Ergebnisse, da nur wenige Bruchstücke entstanden, die auf einer P-30-Säule und einer CMC52-Säule von ungespaltenem Colicin M vollständig abgetrennt werden konnten. Die Aktivität dieser Spaltprodukte, die Molekulargewichte zwischen 8.000 und 14.000 Dalton besaßen, lag wie bei dem APM-Bruchstück etwa um den Faktor 100 niedriger als bei intaktem Colicin M. Es entstanden also auch bei dieser Spaltung Bruchstücke, die um über die Hälfte verkleinert waren und trotzdem noch beträchtliche Aktivität aufwiesen. Eine Charakterisierung dieser Spaltprodukte gelang nicht, da die entstandenen Bruchstücke nicht voneinander getrennt werden konnten.

Ein ganz anderes Ergebnis wurde erzielt, als mit Proteinase K bei pH 6,0 gespalten wurde. Hierbei entstanden Spaltprodukte, die völlig inaktiv waren; ein großes Bruchstück von 24.000 Dalton (Bruchstück B) und ein kleines Bruchstück (Bruchstück A); das Bruchstück A konnte nur insoweit charakterisiert werden, als es den NH_2-Terminus von Colicin M darstellt. Ob es sich hierbei um ein 3.000 Dalton Peptid handelt oder um zwei oder drei kleinere Peptide, konnte nicht gezeigt werden.

Eindeutig verlief die Charakterisierung von Bruchstück B. Durch den Verlust des NH_2-terminalen Endes verlor Bruchstück B seine in vivo-Aktivität. Schutzversuche von sensitiven Zellen gegen Colicin M und den Phagen T5 mit Bruchstück B zeigten,daß das Bruchstück noch an den fhuA-Rezeptor bindet. Auch die Domäne für die Hemmung der Mureinbiosynthese ist in diesem Bruchstück lokalisiert, was sowohl durch Schockexperimente als auch durch in vitro-Aktivitätstests gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse bedeuten, daß der NH_2-Terminus für die Translokation des Bruchstücks B und damit auch für Colicin M wichtig ist.

Dieses Ergebnis steht in völliger Übereinstimmung zu ähnlichen Untersuchungen, die bisher mit den E-Colicinen, Cloacin DF13, Colicin K und Colicin Ia durchgeführt wurden (21, 25, 48, 49, 66, 67). Bei diesen Colicinen ist die Translokation mit dem NH_2-Terminus, die enzymatische Aktivität mit dem COOH-Terminus und die Rezeptorbindung mit dem Zentralteil des Colicinmoleküls assoziiert.

Leider konnte im Verlauf der Arbeit bei Colicin M nicht gezeigt werden, ob die Domäne der Hemmung der Mureinbiosynthese sich am COOH-Terminus befindet oder im Zentralteil des Moleküls. Auch die Rezeptorbindung konnte nicht eindeutig dem Zentralteil zugeordnet werden.

Versuche, durch Abspaltung der COOH-terminalen Aminosäuren zu zeigen, daß die enzymatische Aktivität im COOH-Terminus lokalisiert ist, schlugen fehl, da durch Abspaltung der COOH-terminalen Aminosäuren Arginin und Lysin das Molekül unlöslich wurde und ausfiel.

Vergleicht man die Ergebnisse der Proteinase K-Spaltung und der Aminopeptidase M-Spaltungen, so fällt auf, daß das Bruchstück B, dem der NH_2-terminale Teil fehlt und damit die Domäne für die Translokation, keine in vivo-Aktivität zeigt, während das durch APM entstandene Bruchstück, dem durch die APM-Spezifität ebenfalls der NH_2-Terminus fehlen müßte, noch sensitive Zellen abtöten kann. Dieses Ergebnis kann nur so erklärt werden, daß durch die geringe Größe das APM-Bruchstücke auch ohne die Domäne für Translokation in die Zelle zu seinem Wirkort gelangt, während Bruchstück B dafür zu groß ist.

Um die Transloaktion von Colicin M in die Zelle näher zu untersuchen und auch die Domänen für Rezeptorbindung und Hemmung der Mureinbiosynthese genauer zu lokalisieren, wäre es von großem Interesse, diese Aminopeptidase M-Spaltung und die Isolierung dieses Bruchstückes in präparativem Maßstab durchzuführen. Dann wäre es möglich zu kontrollieren, ob dieses Bruchstück den COOH-Terminus von Colicin M noch trägt, also wirklich vom NH_2-Terminus her von APM gespalten wurde gemäß seiner Spezifität, da außer der Exoproteasen-Aktivität (Spaltung vom NH_2-Ende, auch von Prolin) keine anderen endoproteolytischen Fremdaktivitäten bekannt sind (65, 74).

4.2 "Proform" von Colicin M

Bei einer Mud2(Ap,lac)-Mutagenese mit dem Stamm DR 870, der das Plasmid ColM, ColB trägt, wurden zwei Mutanten isoliert, die keine Colicin M in vivo-Aktivität zeigten. Es fiel auf, daß bei diesen beiden Mutanten eine Proteinbande entstanden war, die um etwa 4.000 Dalton größer war als die Colicin M-Bande. Rohextrakte dieser beiden Mutanten zeigten nach längerem Stehen zum Teil fhuA-abhängige Aktivität (Colicin M-Aktivität) und in wenigen Fällen auch fepA-abhängige Aktivität (Colicin B-Aktivität). Diese beiden Befunde, nämlich die größere Proteinbande und die Autoaktivierung gaben Anlaß zu der Vermutung, daß es sich bei diesem Protein um eine Proform von Colicin M handelt, die in ihrer nichtprozessierten Form inaktiv ist.

Aktivierungsversuche dieser Proform schlugen alle fehl. Da der Vorgang des Prozessierens wahrscheinlich sehr spezifisch ist (da die Mutation sich auf dem Plasmid befindet, mußte sich das für die Prozessierung notwendige Gen ebenfalls auf dem Plasmid befinden), war es nicht unbedingt zu erwarten, daß mit Hilfe von Proteasen eine Aktivierung stattfindet. Auch findet man leicht Erklärungen dafür, daß eine Aktivierung mit Rohextrakten von Stämmen, die das für die Prozessierung notwendige Genprodukt eigentlich besitzen mußten, nicht funktionierte, da es zum Beispiel möglich sein kann, daß zur Abspaltung des Pro-Teils spezifische Bindungen in der Cytoplasmamembran nötig sind.

Da bei Proformen von Proteinen meist der NH_2-terminale Teil verlängert ist und zudem die Bestimmung des COOH-Terminus von Pro-Colicin M eine gewisse Übereinstimmung mit dem COOH-Terminus von Colicin M zeigte, wurde versucht, den NH_2-Terminus bis in die Sequenz des bekannten NH_2-Terminus von Colicin M zu sequenzieren. Dazu hätten etwa 30 - 35 Aminosäuren abgespalten werden müssen. Da Pro-Colicin M für die Sequenzierung nicht völlig sauber in größeren Mengen isoliert werden konnte, gelang nur die Sequenzierung der ersten 19 Aminosäuren. Dieser NH_2-terminale Teil von Pro-Colicin M entspricht nicht den bisher bekannten Signalsequenztypen (s. 1.1), da er insgesamt eher hydrophil ist.

Wenn es sich bei diesem 31.000 Dalton großen Protein wirklich um eine Proform von Colicin M handelt, ist es verwunderlich, daß das reife (aktive) Colicin M ebenso wie die Proform mit Methionin am NH_2-Terminus beginnt.

Mit Colicin M-Antikörpern ist Pro-Colicin M nicht fällbar. Allerdings war der Rohextrakt der Mutante DR 856 im ELISA positiv mit einer etwas schwächeren Reaktion als der Wild Typ, aber stärker als eine ColB, M enthaltene Mutante, die kein Colicin M mehr produziert. Dies könnte bedeuten, daß Pro-Colicin M durch eine andere Sekundärstruktur wie Colicin M keine so gute Affinität zu den Antikörpern besitzt.

Bei der Isolierung von Pro-Colicin M fiel auf, daß dieses 31.000 Dalton große Protein in zwei verschiedenen Peaks von der CMC52-Säule eluiert worden war. Bei einer Salzkonzentration von 30 mM und bei 50 mM erscheinen die Proteine, die aber auf SDS-Polyacrylamid-Gelen die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit haben. Da bei Isolierungen von Colicin M beim Wild Typ und bei weiteren Mutanten diese 31.000 Dalton Bande immer fehlte, muß angenommen werden, daß es sich bei diesen beiden Proteinen um ein und dasselbe Protein handelt, wobei die durch die Trennung auf der Ionenaustauschersäule angezeigte Ladungsdifferenz durch die Abspaltung einer basischen bzw. sauren Aminosäure oder durch eine Desaminierung zustande kommen könnte. Theoretisch möglich wäre eine solche Abspaltung einer oder zweier basischer Aminosäuren am COOH-Terminus von Pro-Colicin M, der nach den unter

Punkt 3.7.2.3 dargestellten Ergebnissen wahrscheinlich aus -Lys-Arg besteht.

Die beiden Mutanten (DR 855, DR 856) haben völlig ihre Immunität sowohl gegenüber Colicin M als auch gegenüber Colicin B verloren. Außerdem konnte auch bei anderen Mutanten, die kein Colicin M und B mehr produzierten oder in ihrer Aktivität vermindert waren, festgestellt werden, daß Aktivität und Immunität fast immer korrelieren. Das heißt, daß eine Mutante, die nur geringe Colicin M-Aktivität aufweist, auch nur geringe Immunität gegenüber Colicin M zeigt oder, daß eine Mutante, die keine Colicin M-Aktivität mehr besitzt, gegenüber Colicin M voll sensitiv ist, obwohl sie das ColM-Plasmid noch besitzt.

Da die Immunität der Produzentenzelle gegenüber ihrem Colicin, soweit bekannt, dadurch zustande kommt, daß ein zweites plasmidcodiertes Protein, das sogenannte Immunitätsprotein, an das Colicin bindet und es damit "neutralisiert", und ein solches Immunitätsprotein bei Colicin M nicht gefunden wurde, liegt der Schluß nahe, daß es sich bei dieser Proform von Colicin M um einen neuen Immunitätsmechanismus handelt, wobei der Pro-Teil kein eigenes Genprodukt darstellt, sondern ein Teil des Colicin-Moleküls ist. Dabei würde beim Ausschleusen der Colicin M-Moleküle der Pro-Teil abgespalten und verbleibt im Cytoplasma oder an der Cytoplasmamembran. Kommen aktive Colicin M-Moleküle von außen, werden diese von dem Pro-Teil neutralisiert. Wird, bewirkt durch eine Mutation, wenig Colicin M produziert, so ist auch wenig Pro-Teil in der Zelle und die Immunität gegen Colicin M ist nur gering. Bei den beiden Mutanten könnte die Mutation in einem Gen liegen, dessen Genprodukt für das Abtrennen des Pro-Teils verantwortlich ist. Da der Pro-Teil aber nicht prozessiert wird, also keine freien Pro-Teile sich in der Zelle befinden, können aktive Colicin M-Moleküle, die von außen kommen, auch nicht neutralisiert werden; dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum die beiden Mutanten sensitiv gegenüber Colicin M sind.

Diese Folgerungen sind als reine Hypothese aufzufassen, mit der man das Auffinden eines inaktiven größeren Colicin M, die Korrealtion zwischen Aktivität und Immunität und auch die Mißerfolge bei der Suche nach einem Immunitätsprotein von Colicin M erklären könnte. Gestützt wird diese These noch durch die Tatsache, daß die beiden Mutanten keine Colicin B-Aktivität zeigen, gegenüber Colicin B sensitiv sind, aber im ELISA eine recht hohe Affinität gegen die Colicin B-Antikörper aufweisen und in einigen wenigen Fällen nach einiger Zeit in Rohextrakten Colicin B-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Falls sich die Ergebnisse und vor allem diese These bestätigen sollten, was im Moment durch Klonierung des Strukturgens für Colicin M und Colicin B und anschließende Sequenzierung versucht wird, wäre dies der erste bekannte Fall, bei dem ein Colicin am NH_2-terminalen Teil verlängert ist und diese Verlängerung für die Immunität oder die Sekretion oder für beide Prozesse verantwortlich ist.

Ein ähnlicher Fall ist bisher nur für das Colicin El beschrieben (65, 70), bei dem die Verlängerung am COOH-terminalen Teil lokalisiert ist. Ob diese COOH-terminale Verlängerung für die Immunität der Produzentenzelle verantwortlich ist oder für die Ausscheidung des Colicins, konnte bisher nicht entschieden werden, wobei die Sequenz dieses Pro-Teils im Gegensatz zu dem Pro-Teil von Colicin M den Anforderungen einer Signalsequenz voll entspricht.

5. Zusammenfassung

Die funktionalen Domänen von Colicin M wurden bestimmt. Durch Spaltung von Colicin M mit Proteinase K entstanden zwei Bruchstücke, die von ungespaltenem Colicin M abgetrennt und isoliert wurden. Die Charakterisierung dieser Bruchstücke ergab, daß die Domäne für die Translokation des Colicin M-Moleküls in die Zelle direkt am NH_2-Terminus lokalisiert ist, während die Rezeptorbindung und die Hemmung der Mureinbiosynthese im Zentralteil des Moleküls und (oder) am COOH-terminalen Ende liegen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit ähnlichen Untersuchungen bei den E-Colicinen, Cloacin DF13, Colicin K und Colicin Ia.

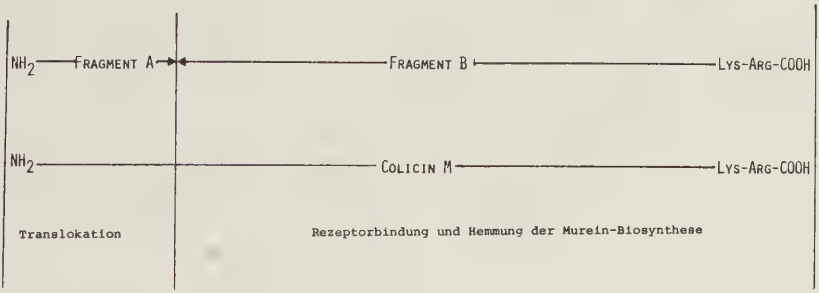


Abb. 33: Domänen bei Colicin M.

Nach einer Mud2(Ap,lac)-Mutagenese mit dem Stamm DR 870 wurden zwei Mutanten isoliert, die ein größeres Colicin M produzieren und völlig inaktiv sind. Nach längerem Stehenlassen der Rohextrakte findet eine leichte Autoaktivierung statt, d.h. man kann geringe Colicin M- und in einigen Fällen Colicin B-Aktivität feststellen. Die Vermutung lag nahe, daß es sich bei diesem Protein um eine Proform von Colicin M handelt. Eine Aktivierung dieser Proform mit zugesetzten Proteasen gelang nicht.

Die Tatsache, daß die beiden Mutanten ihre Immunität gegenüber Colicin M verloren haben, gab Anlaß zu der Spekulation, daß dieser Pro-Teil von Colicin M eine Art Immunitätsprotein darstellt, der beim Ausschleusen von Colicin M aus dem Cytoplasma abgespalten wird und in der Zelle verbleibt. Durch die Abspaltung wird Colicin M aktiviert. Gestützt wird diese These auch durch die Ergebnisse, daß andere Mutanten, die weniger oder kein Colicin M mehr produzieren, eine geringere oder keine Immunität mehr gegenüber Colicin M zeigen.

Ob dieser Pro-Teil von Colicin M eine Art Immunitätsprotein darstellt oder (und) für die Sekretion von Colicin M ins Periplasma verantwortlich ist, sollen Untersuchungen erbringen, bei denen die Strukturgene von Colicin M und Colicin B kloniert und sequenziert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ambler, R.P. (1972).
Methods in Enzymology XI (14), 155-165.

2. Bachmann, B.J., Low, K.B. (1980).
Mikrobiol. Rev. 44, 1-56.

3a. Bedonelle, H., Bassford, P., Fowler, A., Zabin, I.,
Beckwith, J., Hofnung, M. (1980).
Nature 285, 78-81.

3. Blobel, G., Dobberstein, B. (1975).
J. Cell Biol. 67, 835-851.

4. Böhlen, P., Stein, S., Dairman, W., Udenfriend, S. (1973).
Arch. Biochim. Biophys. 155, 213-220.

6. Bowles, L.K., Konisky, J. (1981).
J. Bacteriol. 145, 668-671.

7. Bowman, C.M., Sidikaro, J., Nomura, M. (1971).
Nature (London) New Biol. 234, 133-137.

8. Brandis, H., Smarda, J. (1971).
Bacteriocine und bacteriochinähnliche Substanzen.
Gustav Fischer Verlag Jena.

9. Braun, V., Frenz, J., Hantke, K., Schaller, K. (1980).
J. Bacteriol. 142, 162-168.

10. Braun, V., Schaller, K., Wabl, M.R. (1974).
Antimicr. Agents Chemother. 5, 520-533.

11. Braun, V., Hantke, K. (1981).
Review Bacterial Cell Surface Receptors.
In: Organization of Prokaryotic Cell Membranes, Vol. II,
CRS Press, Inc. Florida.

12. Braun, V., Schaler, K., Wolff, H. (1973).
Biochim. Biophys. Acta 333, 87-97.

13. Brey, R.N. (1982).
J. Bacteriol. 149, 306-315.

14. Casadaban, M.J. (1979).
PNAS 76, 4530-4533.

15. Casrell, J.V., Cervera, M., Marco, R. (1979).
Anal. Biochem. 99, 379-391.

16. Chang,J.Y., Brauer, D., Wittmann-Liebold, B. (1978).
FEBS Letters 93, 205-214.

17. Chang, C.N., Blobel, G., Model, P. (1978).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 316-365.

18. Collier, R.J. (1977).
In: Receptors and Recognition. Series B 1, 67-98.

19. Conboy, G., Rosenberg, J.F. (1981).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3073-3077.

20. Dagert, M., Ehrlich, S.D. (1979).
Gene 6, 23-28.

21. Dankert, J.R., Uratani, Y., Graban, C., Cramer, W.A.,
Hermodson, M. (1982).
J. Biol. Chem. 257, 3857-3863.

22. Davies, J.K., Reeves, P. (1975).
J. Bacteriol. 123, 96-101.

23. Davis, B.D., Tai, P.C. (1980).
Nature (London) 283, 433-438.

24. De Graaf, F.K., Klaasen-Boor, P. (1977).
Eur. J. Biochem. 73, 107-114.

25. De Graaf, F.K., Sukart, M.J., Boodgerd, F.C., Metselaar, K. (1978).
Biochem. 17, 1137-1142.

26. Di Musi, D.R., Whtie, J.C., Schnaitman, C.A., Bradbeer, C. (1973).
J. Bacteriol. 115, 506-513.

27. Fairbanks, G., Stock, T.K., Wallach, D.F.M. (1971).
Biochemistry 10, 2606-2617.

28. Fraenkel-Conrat, H., Harris, J.I., Levy, A.L. (1955).
Methods Biochem. Anal. 2, 383-425.

29. Gaastra, W., Ondega, B., de Graaf, F.K. (1978).
Biochim. Biophys. Acta 540, 301-312.

30. Goebel, W.F., Barry, G.T. (1958).
J. Exp. Med. 107, 185-209.

31. Gould, J.M., Cramer, W.A. (1977).
J. Biol. Chem. 252, 5491-5497.

32. Gratia, A. (1925).
Comtes rendus de la Societé de Biologie.

33. Gutermann, S.K. (1971).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1149-1155.

34. Ha Chang, C., Goldberg, A.L. (1982).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 795-799.

35. Imamura, T., Konishi, K., Yokoyama, M., Konishi, K. (1979).
J. Biochem. 86, 639-642.

36. Inouye, H., Beckwith, J. (1977).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1440-1444.

37. Inouye, S. Wang, S., Sekizawa, J., Halegona, S., Inouye, M. (1977).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1004-1008.

38. Jakes, K., Model, P. (1979).
J. Bacteriol. 138, 770-778.

39. Jakes, K.S., Zinder, N.D. (1974).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3380-3384.

40. Laemmli, U.K. (1970).
Nature 227, 680-685.

41. Lenard, J. (1971).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 662-668.

42. Lingappa, V.R., Lingappa, J.R., Blobel, G. (1979).
Nature (London) 281, 117-121.

43. Loewenstein, J., Scholte, M.R., Wit-Peeters, E.M. (1970).
Biochim. Biophys. Acta 223, 432-436.

44. Luckey, M., Wayne, R., Neilands, J.B. (1975).
Biochem. Biophys.Res. Commun. 64, 687-693.

45. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters. R., van der Hoek, P., van Alphen, L. (1975).
FEBS Lett. 58, 254-258.

46. Miller, J.H. (1972).
Experiments in Molekular Genetics. Cold Spring Harbor, Lab. 201.

47. Morra, N., Nakamura, K., Inouye, M. (1980).
J. Biol. Chem. 255, 27-29.

48. Mueckler, M.M., Himeno, M., Pitot, H.C. (1982).
J. Biol. Chem. 257, 7178-7180.

49a. Ohno-Iwashita, Y., Imahori, K. (1980).
Biochem. 19, 652-659.

49. Ohno-Iwashita, Y., Imahori, K. (1982).
J. Biol. Chem. 257, 6446-6451.

50. Ouchterlony, O., Nilsson, L.A. (1973).
In: D.M. Weir (ed.), Handbook of Experimental Immunology, pp. 19.1-19.39. Blackwell, Oxford.

51. Pappenheimer, A.M., Gill, D.M. (1973).
Science 182, 353-358.

52. Pugsley, A.P., Reeves, P. (1976).
J. Bacteriol. 127, 218-228.

53. Pugsley, A.P., Reeves, P. (1977).
Antimicrob. Agents Chemother. 11, 345-358.

54. Randal, L.L., Hardy, S.J. (1977).
Eur. J. Biochem. 75, 43-53.

55. Schaller, K., Dreher, R., Braun, V. (1981).
J. Bacteriol. 146, 54-63.

56. Schaller, K., Höltje, J.K., Braun, V. (1982).
J. Bacteriol. 152, 994-1000.

57. Schaller, K., Nomura. M. (1976).
Proc. Natl. Acad. S[illegible]. USA 73, 3989-3993.

58. Schneider, W.C., Hogeboom, G.H. (1950).
J. Biol. Chem. 183, 123-128.

59. Schröder, J. (1980).
Biologie in unserer Zeit 10, 11-16.

60. Schumann, W. (1981).
Biologie in unserer Zeit 11, 65-70.

61. Silver, P., Watts, C. Wickner, W. (1981).
Cell 25, 341-345.

62. Towbin, M., Staehelin, T., Gorden, J. (1979).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.

63. Varenne, S., Cavara, D., Lazdunski, C. (1981).
Eur. J. Biochem. 116, 615-620.

64. Voller, A., Bidwell, D., Bartlett, A. (1976).
In: N.R. Rose and H. Friedman (eds.)., Manual of Clinical Immunology, pp. 506-512, American Society for Microbiology, Washington D.C.

65. Wachsmuth, E.D., Fritze, I., Pfleiderer, G. (1966).
Biochemistry 5, 169-175.

66. Watson, D.H. (1980).
Biochim. Biophys. Acta 662, 287-296.

67. Watson, D.H., Sheratt, D.J. (1979).
Nature 278, 362-364.

68. Watts, C., Silver, P., Wickner, W. (1981).
Cell 25, 347-353.

69. Weaver, C.A., Redborg, A., Konisky, J. (1981).
J. Bacteriol. 148, 817-828.

70. Wilson, V., Hogg, R. (1980).
J. Biol. Chem. 255, 6745-6750.

71. Wittmann-Liebold, B., Lehmann, A. (1975).
Solid Phase Methods in Protein Sequenz Analysis, pp. 81-90.
Pierce Chem. Co., Rockford, Il.

72. Wolfe, P.B., Silver, P., Wickner, W. (1982).
J. Biol. Chem. 257, 7898-7902.

73. Yamada, M., Ebina, Y., Miyata, T., Nakazawa, T.,
Nakazawa, A. (1982).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2827-2831.

74. Merck-Biochemica S. 5.

Lebenslauf

	Ralf Michael Dreher geboren am 31. Januar 1953 in Sigmaringen
April 1959 - März 1963	Besuch der Volksschule Sigmaringen
April 1963 - April 1970	Staatlich anerkanntes Internatsgymnasium Kolleg St. Blasien
April 1970 - Juni 1972	Internatsschule Privat-Gymnasium Wilhelmshöhe in Kassel/Hessen
22. Juni 1972	Reifeprüfung für Nichtschüler in Kassel
Oktober 1972	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe
April 1978	Beendigung des Studiums der Lebensmittelchemie mit dem Staatsexamen Teil A
Dezember 1978	Praktikant der Lebensmittelchemie an der Chemischen Landesuntersuchungsanstalt Karlsruhe
März 1980	Beendigung des Praktikums mit dem Staatsexamen Teil B
Mai 1980 - April 1983	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie II der Universität Tübingen, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun

Meine akademischen Lehrer waren:

H. Bärnighausen, V. Braun, E. Fitzer, E.K. Franck, G. Fritz, K. Grimm, K. Hantke, W. Heimann, G. Herz, H. Hopf, G. Jurziza, K. Krogmann, K. Kühlwein, D. Kummer, F.v. Massow, H. Musso, H. Niebergall, J. Retey, U. Schiederwolf, G. Schröder, K. Wisser.

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)